(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. April 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/23894 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: G01N 33/68, C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09468

(22) Internationales Anmeldedatum: 28. September 2000 (28.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 46 546.0 28. September 1999 (28.09.1999) DE
100 14 234.6 22. März 2000 (22.03.2000) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: BIESCHKE, Jan [DE/DE]; Eichweg 8, 37077 Göttingen (DE). GIESE, Armin [DE/DE]; Hermann-Hahn-Platz 7, 84177 München (DE).

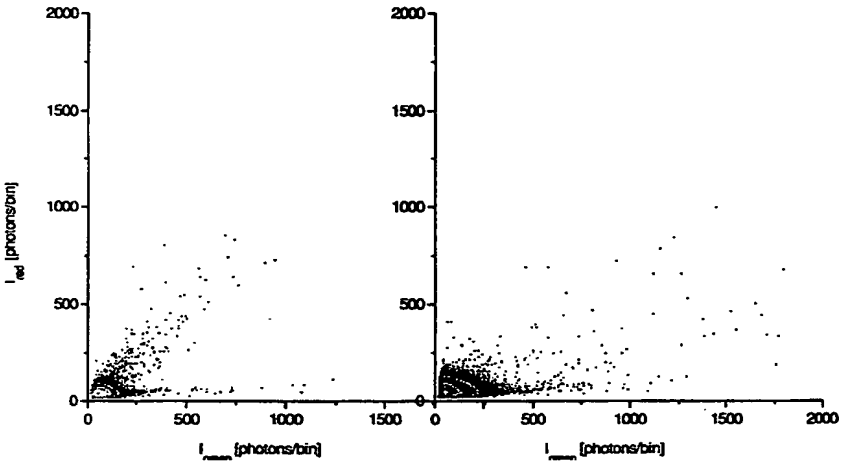
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: JP, US.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: QUANTITATIVE ANALYSIS AND TYPIFICATION OF SUBCELLULAR PARTICLES

(54) Bezeichnung: QUANTITATIVE ANALYSE UND TYPISIERUNG SUBZELLULÄRER PARTIKEL



human PrPSc 129(M/M) type 2 (94-3)
probes: mAB 917 (green), mAB 12F10 (red)

human PrPSc 129(M/M) type 1 (93-281)

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining and individually characterizing particles by means of at least two different detectable probes in a sample. According to said method, the particles, especially molecules or molecule aggregates, have at least one binding site, preferably a number of binding sites for at least one of the at least two different detectable probes. The at least two different detectable probes are present in the sample. A measure for the number of bound probes and the relationship between the bound probes are established by determining particles, this determination taking place on the basis of individual particles.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Bestimmung und individuellen Charakterisierung von Partikeln mittels mindestens zweier unterschiedlicher detektierbarer Sonden in einer Probe, wobei die Partikel, insbesondere Moleküle oder Molekülaggregate, mindestens eine Bindungsstelle, vorzugsweise eine

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/23894 A1

(84) **Bestimmungsstaaten** *(regional)*: europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht:
— *Mit internationalem Recherchenbericht.*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Vielzahl von Bindungsstellen für mindestens eine der mindestens zwei unterschiedlichen detektierbaren Sonden aufweisen; die mindestens zwei unterschiedlichen detektierbaren Sonden in der Probe anwesend sind; ein Maß für die Anzahl der gebundenen Sonden und das Verhältnis der gebundenen Sonden zueinander durch Bestimmung von Partikeln ermittelt wird; und wobei die Bestimmung auf Basis von einzelnen Partikeln erfolgt.

Quantitative Analyse und Typisierung subzellulärer Partikel

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung und individuellen Charakterisierung von Partikeln, insbesondere subzellulären Partikeln wie z.B. Molekülen, Molekülaggregaten oder Viren.

Ein möglicher und beispielhaft realisierter Einsatzbereich des vorliegenden Verfahrens ist die Diagnostik von Prionkrankheiten und Typisierung verschiedener Erregerstämme. Die Prionkrankheiten oder transmissiblen spongiformen Enzephalopathien stellen eine Gruppe übertragbarer neurodegenerativer Krankheiten bei Mensch und Tier dar, zu der die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit des Menschen sowie Scrapie beim Schaf und BSE beim Rind gehören. Prionerkrankungen sind charakterisiert durch die Ablagerung einer aggregierten, pathologischen Form des Prionproteins (PrP) im Gehirngewebe betroffener Individuen, die als PrP^{Sc} bezeichnet wird. Grundsätzlich sind Prionerkrankungen übertragbar, das übertragbare Agens wird als "Prion" bezeichnet. Es wird angenommen, dass PrP^{Sc} der entscheidende, wenn nicht sogar der einzige Bestandteil des Prions ist. Eine erregerassoziierte Nukleinsäure konnte nicht nachgewiesen werden. Das krankheits- und infektiositätsassoziierte PrP^{Sc} unterscheidet sich von der physiologisch im Organismus vorkommenden Form des Prionproteins (PrP^{c}) durch seine Konformation, insbesondere seinen hohen Anteil an ß-Faltblattstruktur, seine relative Resistenz gegenüber Protease K und seine Neigung zur Bildung großer multimerer Aggregate. Es wird im Rahmen der sogenannten Prionhypothese angenommen, dass die PrP^{Sc}-Form mit der PrP^{C}-Form in Wechselwirkung treten und dabei das körpereigene PrP^{c} über eine Konformationsänderung in die PrP^{Sc}-Form umwandeln kann. Das so neu entstandene PrP^{Sc} kann dann seinerseits mit weiteren PrP^{Sc} Molekülen in Wechselwirkung treten und diese ebenfalls in PrP^{Sc} umwandeln, so dass sich in einer lawinenartigen Kettenreaktion aus dem körpereigenen PrP^{Sc} große Mengen PrP^{Sc} bilden.

Ein wichtiges Phänomen bei den Prionkrankheiten ist das Auftreten verschiedener Erregerstämme. Erregerstämme unterscheiden sich auch bei Passage in Wirten mit identischem Prionprotein, z.B. in Maus-Inzuchtstämmen, konstant

in verschiedenen Eigenschaften wie Inkubationszeit, klinischen Symptomen, Läsionsmuster im Gehirn und Übertragbarkeit auf andere Spezies. Im Rahmen der Prionhypothese bedeutet das Auftreten verschiedener Erregerstämme in Tieren mit gleicher PrP-Aminosäuresequenz, dass verschiedene stabile Formen von PrP^{Sc} existieren müssen, die jeweils PrP^{C} in die entsprechende pathologische Form umwandeln können. Auch bei der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit des Menschen finden sich verschiedene distinkte Unterformen, die sich molekular anhand eines Polymorphismus am Codon 129 des Prionproteingens *(PRNP)* und der Größe des Proteinase K-resistenten Fragmentes des Prionproteins im Westernblot unterscheiden lassen, und mit unterschiedlichen phänotypischen Krankheitsausprägungen assoziiert sind.

Das der Erfindung zugrundeliegende Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, das einzelne pathologische Proteinaggregate in einem homogenen Assay ultrasensitiv detektierbar macht und die detektierten Aggregate zu charakterisieren und zu typisieren.

Darüber hinaus sollte dieses Verfahren auch breit anwendbar sein, um andere bevorzugt subzelluläre Partikel zu detektieren und charakterisieren.

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Bestimmung und individuellen Charakterisierung von Partikeln mittels mindestens zweier unterschiedlicher detektierbarer Sonden in einer Probe vorgeschlagen, wobei

- die Partikel, insbesondere einzelne Moleküle oder Molekülaggregate, mindestens eine Bindungsstelle, vorzugsweise eine Vielzahl von Bindungsstellen für mindestens eine der mindestens zwei unterschiedlichen detektierbaren Sonden aufweisen,
- die mindestens zwei unterschiedlichen detektierbaren Sonden in der Probe anwesend sind,
- ein Maß für die Anzahl der gebundenen Sonden und
- das Verhältnis der gebundenen Sonden zueinander durch Bestimmung von Partikeln ermittelt wird

- und wobei die Bestimmung auf Basis von einzelnen Partikeln erfolgt.

Erfindungsgemäß wird ferner ein Verfahren vorgeschlagen zur Charakterisierung pathologischer Prionproteine nach Subspezies durch deren Markierung mit Sondenmolekülen, wobei die Bindung mindestens zweier unterschiedlicher Sondenmolekülen an die Prionproteine detektiert wird und aus dem Verhältnis der gebundenen Mengen an verschiedenen Sondenmolekülen zueinander die Subspezies bestimmt wird.

Figur 1 zeigt Zweifarben-Intensitätshistogramme von humanem PrP^{Sc} Typ 1 und Typ 2.

Figur 2 zeigt die relative Verteilung des Signals der gebundenen PrP-spezifischen Sonden (12F10-Cy5) und (pri917-Alexa488) für menschliches PrP^{Sc} (129 M/M) Typ 1 und PrP^{Sc} (129 M/M) Typ 2. Im Signal des MM 2 PrP ist der Anteil beider Sonden annähernd gleich während das Signal der MM 1 Aggregate weniger als 20% rotes (12F10) Signal zeigt.

Figur 3: Schematischer Aufbau der konfokalen Zweifarben-Fluoreszenz-Spektroskopie-Apparatur.

Figur 4: Anlagerung von fluoreszenten Sonden an PrP-Aggregate. Spur der Fluoreszenzintensität *I* a) ohne Anwesenheit b) mit Anwesenheit von pathogenen PrP^{sc}-Aggregaten in Spinalliquor. Als Sonde diente rPrP-Cy2 (c = 10 nM), Anregung bei 488 nm, 180 µW, Messzeit 21 min. *Unten:* Zahl der detektierten Aggregate je Zeiteinheit im Verlauf der Messung.

Figur 5: *Links:* Bestimmung der Aggregatgröße durch ein heterologes Sondenpaar. Voraggregiertes rPrP(90-231), monomere Konzentration 0,1 µM, wurde durch ein Sondenpaar aus rPrP-Oregon Green (c = 2 nM) und dem Antikörper 15B3-Cy5 (c = 10 nM) detektiert. Gesamtmesszeit 20 * 1 min. Während der Einzelmessungen wurden nur einzelne markierte Aggregate detektiert, deren Durchtrittszeit anhand des Kreuzkorrelationsignals bestimmt wurde. Dargestellt ist Fluoreszenzspur und Kreuzkorrelationssignal einer Einzelmessung mit $\tau \approx 15$ ms. *Rechts:* Homologe Detektion mit rPrP-Oregon Green.

Figur 6: Quantitative Intensitätsanalyse des Fluoreszenzsignals. a) Fluoreszenzspur Sonde + PrP-Aggregate, C) Intensitätshistogramm von a), b) Fluoreszenzspur der freien Sonde (rPrP-Cy2), d) Intensitätshistogramm des Fluoreszenzsignals b), Binweite 250 µs.

Figur 7: Histogramm der Fluoreszenzintensität Binweite 500 µs. a) Antikörpersonde 3F4-Alexa488 c = 6 nM Anpassung durch Log-Normalverteilung (s. Gl. 9) mit υ = 32, σ = 16. b) *prion-rods* c = 0.35 nM, Anpassung durch einen Sondenterm mit $\upsilon 1$ = 30 und einen zweiten Term mit $\upsilon 2$= 200.

Figur 8: Einfluss der Probenbewegung auf die Anzahl der detektierten Ereignisse. Intensitätsspur und Intensitätshistogramm von fluoreszenten Polystyrolbeads in PBS + 0.1% (w/v) NP40 bei Anregung mit 488 nm. *oben:* Messung ohne Bewegung, *unten:* mit Bewegung der Messkapillare mit 1 mm/s. Die Zahl der detektierten Ereignisse steigt etwa 100-fach. *rechts:* Intensitäthistogramm beider Messungen. Durch Bewegung der Probe steigt die Zahl der Kanäle mit einer Intensität > 500 Photonen/Kanal vierfach.

Figur 9: Evaluierung unterschiedlicher Sondenmoleküle. Hamster rPrP(90-231), markiert mit Oregon Green, (A,B) und monoklonaler Antikörper 3F4, markiert mit Alexa488, (C,D) wurden zu Liquor von Kontrollpatienten zugegeben, der mit *prion-rods* versetzt wurde. Die Messung erfolgt 600 s mit einer Probenbewegung von lmm/s und einer Binweite von 500 µs. Das Signal hoher Intensität wurde mit einer Schwelle (s. Pfeil) von 500 Photonen/Bin abgetrennt (B,D).

Figur 10: Peaksignal der *prion-rods* aus Fig. 9 C in Abhängigkeit von der Konzentration der Zielmoleküle bei einer Schwelle von a) 350, b) 500, c) 750, d) 1000 Photonen/Bin. Die Detektionsgrenze beträgt 2 pg. *Einsatz:* Peaksignal von 110 pg PrP^{Sc} in Abhängigkeit vom Schwellenwert.

Figur 11: Prinzip der Zweikanal-Intensitätsanalyse. Rot und grün markierte Antikörper (3F4-Alexa 488, c = 5 nM, 12F10-Cy5, c = 6nM) wurden zu Liquor von Kontrollpatienten zugegeben, der mit *prion-rods* versetzt wurde (1:500). Die Messung erfolgt 600 s mit einer Probenbewegung von 1 mm/s und einer

Kanalweite von 500 µs. Das koinzidente Signal hoher Intensität wird mit einer progressiven Schwelle vom Signal der freien Sonden und Signal hoher Intensität der Einzelkanäle abgetrennt. Jeder Punkt entspricht einem Intensitätspaar. Die Zahl der Messkanäle ist logarithmisch auf einer Farbskala dargestellt.

Figur 12: Spezifität der Detektion von Aß und PrP Zielmolekülen durch Zweikanal-SIFT. Es wurden spezifische und unspezifische Paare von Sonden und Zielmolekülen kombiniert: a) voraggregiertes A*ß*(1-42)-Peptid (1 µM) + A*ß*-Antikörper (6E10-Cy5, p42-Alexa), b)A*ß*(1-42)Peptid (1 µM) + PrP-Antikörper (3F4-Alexa, 12F 10-Cy5), c) *prion rods* 1:1000 + PrP-Antikörper (3F4-Alexa, 12F10-Cy5), d) c) *prion rods* 1:1000 + irrelevante Antikörper (Anti-IL8-Oregon Green, Anti-A*ß*-Cy5.)

Figur 13: Western Blot und Zweikanal-SIFT Messung einer Verdünnung von *prion rods* in Spinalliquor. Das Hirnhomogenat eines scrapie-infizierten Hamsters 263K (a-f) und *prion rods* in Liquor wurden wie angegeben verdünnt. A:PrP^{Sc} wurde mit Proteinase K (100 µg/ml) 30 min bei 37°C verdaut und anschließend durch Western Blot mit dem Antikörper 3F4 nachgewiesen. B: Parallel wurden Aliquots der *prion rods* durch Zweikanal-SIFT gemessen und das Signal wie in Fig. 11 beschrieben ausgewertet.

Figur 14: Histogrammdarstellung der Zweikanal-SIFT Messung einer Verdünnung von pri*on rods* in Spinalliquor. A: Verdünnung 1:2000, B: $1:10^5$, C: ohne PrP^{Sc}.

Figur 15: a) Kreuzkorrelationssignal einer Verdünnung von *prion rods* in Spinalliquor. PrP^{Sc}-Konzentration: 160 pM (Linie), 56 pM (Striche), 20 pM (Punkte), 6 pM (Strichpunkte), 2 pM (kurze Striche), ohne Rods (dünne Linie). b) Auftragung Kreuzkorrelationsamplitude $G_{ij}(0)$ gegen die eingesetzte Menge an PrP^{Sc}. c) Auftragung der Zahl der Messkanäle hoher Fluoreszenzintensität der Zweikanal-SIFT Analyse gegen die Kreuzkorrelationsamplitude $G_{ij}(0)$.

Figur 16: Auftragung der Zahl der Messkanäle hoher Fluoreszenzintensität der Zweikanal-SIFT-Analyse gegen die Kreuzkorrelationsamplitude $G_{ij}(0)$ von aggregiertem A*ß*(1-42) Peptid in verschiedenen Medien. Die Messung erfolgte wie in Fig. 11 in Liquor und Puffer mit und ohne Detergenz (Puffer: PBS, PBS +

0.1% NP40, RIPA, PBS + 0.2% SDS, Liquor, Liquor + 0.1% NP40). Als spezifische Antikörpersonden dienten pAB42-Alexa und 6E10-Cy5, c = 6 nM. Unabhängig vom verwendeten Medium waren beide Signale proportional.

Figur 17: Zweikanal-SIFT Messung in Liquorproben von CJD und Kontrollpatienten. Die Messung erfolgte für 600s mit einer Kanalweite von 0.5 ms wie in Fig. 11 beschrieben. Als Sonden dienten die monoklonalen Antikörper 3F4-Alexa488 und 12F10-Cy5. In 5 von 24 CJD-Liquorproben lag das Signal über einer Schwelle von einem Kanal, dagegen enthielt keine der Kontrollen mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen positives Signal.

Figur 18: Zweikanal-SIFT Messung in Liquorproben von AD und Kontrollpatienten. Die Messung erfolgte für 600s mit einer Kanalweite von 0.5 ms wie in 11 beschrieben. Als Sonden dienten die Antikörper pAB42-Alexa488 und 6E10-Cy5. In 5 von 6 Patienten mit klinischer Alzheimerdiagnose, jedoch in keiner der Kontrollen lag das Signal über dem gesetzten Schwellenwert.

Figur 19: Zweikanal-SIFT Messung in Liquorproben von AD und Kontrollpatienten. Die Messung erfolgte für 600s mit einer Binweite von 0.5 ms wie in 11 beschrieben. Als Sonden dienten die Antikörper pAB42-Alexa488 und 6E10-Cy5. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme asserviert.

Figur 20: Bestimmung des Bindungsverhältnisses der Sonden. Signal einer Zweikanal-SIFT Messung an humanem PrP^{Sc} (129M/M) Typ II. Die Messung erfolgte für 600s mit einer Kanalweite von 0.5 ms wie in 11 beschrieben. Als Sonden dienten die Antikörper Pri917-Alexa488 und 12F10-Cy5. Das PrP^{Sc}-spezifische Signal > 8 I_{max} wurde in neun Sektoren gleicher Signalverhältnisse aufsummiert.

Figur 21: PrP^{Sc} Typ I und Typ II im SIFT-Signal von humanem PrP^{Sc} (129 M/M). Das gereinigte PrP^{Sc} wurde 1:10 in Liquor von Kontrollpatienten unter Zugabe von 0.1% NP40 verdünnt. Messung und Auswertung erfolgte wie in Fig. 20 beschrieben. a) Signalanteile beider Sonden in der Messung von (M/M) Typ I und (M/M) Typ II PrP^{Sc} mit Anpassung durch eine Normalverteilung. b) Signalanteile beider Sonden in der Summation der Einzelmessungen von PrP^{Sc} Typ I und Typ II (grau) sowie Messung einer Mischung beider PrP^{Sc} Typen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird vorzugsweise das Verhältnis der gebundenen Sonden zueinander durch Bestimmung von Partikeln in einem Messvolumen, das ein Teilvolumen der zu untersuchenden Probe darstellt, ermittelt. Besonders bevorzugt ist die Bestimmung auf Basis von einzelnen Partikeln, die sich zu verschiedenen Zeiten im Messvolumen befinden.

Die Detektion verschiedener gebundener Sonden erfolgt vorzugsweise gleichzeitig an einem Partikel.

Vorzugsweise beträgt das Messvolumen $\leq 10^{-12}$, insbesondere $\leq 10^{-14}$ l. Die Messung erfolgt insbesondere unter Verwendung eines konfokal mikroskopischen Aufbaus, eines Nahfeldaufbaus oder eines Aufbaus zur Mehrphotonenanregung. Die Bestimmung und Charakterisierung von Partikeln erfolgt insbesondere in einem homogenen Assayverfahren ohne Waschschritte.

Eine vorteilhafte Möglichkeit der Charakterisierung von Partikeln, wie z.B. pathologischer Prionproteinaggregaten (im folgenden "Zielmoleküle" genannt) ist deren Markierung mit geeigneten fluoreszenzmarkierten Sondenmolekülen und die anschließende Detektion und Analyse einzelner Aggregate. Hierfür dient aufbauend auf einem gerätetechnischen Aufbau zur Zweifarben-Fluoreszenz-Spektroskopie, ein Messverfahren, das im folgenden in einer spezifischen Ausführungsform als SIFT (Scanning for Intensely Fluorescent Targets) bezeichnet wird. Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf einer zeitaufgelösten Intensitätsanalyse eines Fluoreszenzsignals aus einem offenen Volumenelement, das durch eine konfokale Figur eines oder mehrerer in einem Fokus gebündelter Anregungs-LASER definiert wird. Dieses Verfahren unterscheidet sich vom Stand der Technik zur FCS-basierten Amyloid-Aggregat-Detektion (Pitschke et al. 1998) durch insbesondere folgende Modifikationen:

a) Erfindungsgemäß erfolgt eine Quantifizierung des partikelbedingten Signalanteils vorzugsweise durch Analyse der Intensitätsverteilung eines gemessenen Detektionssignals, insbesondere eines Fluoreszenzsignals, in sukzessiven Zeitfenstern mit Detektionszeiten konstanter oder variabler Längen im Bereich von Mikro- bis Millisekunden, dadurch kann das sehr intensive Signal der mehrfach markierten Zielmoleküle vom Hintergrundsignal freier

Sondenmoleküle abgetrennt werden. Alternativ könnte die intensitätsbasierte Abtrennung des Zielmolekül bedingten Signalanteils auch über einen Algorithmus zur Peakdetektion und -analyse erfolgen.

b) Erfindungsgemäß erfolgt vorzugsweise ein Scannen der Probe durch Erzeugen einer im wesentlichen konstanten Relativbewegung zwischen Probe und Messvolumen. Dieses Ziel ist in einem bevorzugten Messaufbau durch ein mäanderförmiges Bewegen der in eine Messkapillare eingefüllten Probe realisiert. In einer weiteren Ausführungsform kann dieser Aspekt auch durch eine Optik, die eine Bewegung des Fokus gestattet oder durch eine Flusskapillare realisiert werden. Das Scannen bewirkt zwei Vorteile:

1. Das untersuchte Volumen und damit die Messsensitivität wird deutlich erhöht.

2. Für große, sehr langsam diffundierende Zielmoleküle wird die mittlere Aufenthaltsdauer im Fokus nicht mehr durch die Diffusionszeit T_{Diff}, sondern durch die Scangeschwindigkeit bestimmt. Dies ist vorteilhaft, weil im wesentlichen alle Zielmoleküle auf etwa die gleiche Zahl Messkanäle abgebildet werden. Dadurch wird die Anzahl der sehr intensiven Kanäle ein direktes Maß für die Zahl und Konzentration stark markierter Zielmoleküle.

c) Erfindungsgemäß bevorzugt wird die Verwendung von Antikörpern als Sondenmoleküle. Diese haben im Vergleich zu monomeren Aggregat-Bausteinen den Vorteil einer geringen Selbstaggregation. Dieser Punkt wird erfindungsgemäß zwar bevorzugt, das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich aber prinzipiell mit jeder spezifisch an das Zielmolekül bindenden bevorzugt fluoreszenzmarkierten Sonde durchführen.

d) Das erfindungsgemäße Verfahren setzt insbesondere eine simultane Analyse zweier oder mehrerer getrennt im selben Messvolumen messbarer, in verschiedenen Wellenlängenbereichen oder Polarisationsebenen emittierender Sonden, insbesondere fluoreszierender Sonden ein. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäß ermittelten Daten aus Mehrfach-, insbesondere Zweifarb bzw. -polarisationsmessungen ermittelt und zur Auswertung in einem

entsprechend mehrdimensionalen, insbesondere zweidimensionalen Array angeordnet und z.B. als Intensitätshistogramm dargestellt. Dabei ist die Zahl von Kanälen mit gleichzeitig hohen Werten für die mehreren oder beiden Farben/Polarisationen ein Maß für die Zahl und Konzentration spezifisch für mit mehreren, insbesondere zwei unabhängigen Sonden markierten Zielmolekülen. Wie schon unter Punkt a) erwähnt, ist hier alternativ eine mehrfarbige Peakanalyse möglich.

Erfindungsgemäß können pathologische Proteinaggregate als Partikel, insbesondere Prionproteine nach Subspezies, durch deren Markierung mit Sondenmolekülen, detektiert werden.

Vorzugsweise wird die Bindung mindestens zweier unterschiedlicher Sondenmoleküle an die Proteinaggregate bildenden Partikel detektiert und aus dem Verhältnis der gebundenen Mengen an verschiedenen Sondenmolekülen zueinander die Subspezies bestimmt.

Zur Erregerstammtypisierung oder Untersuchung der relativen Bindung von Proteinen verschiedener Spezies an pathologische Proteinaggregate einer bestimmten Spezies zwecks Abschätzung einer Speziesbarriere für eine Krankheitsübertragung kann das erfindungsgemäße Verfahren ebenfalls eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann dieses zur Untersuchung degenerativer Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativer Krankheiten, mit Bildung pathologischer Aggregate, insbesondere Aggregate, die als Komponente Prionprotein, APP, Tau, Synuclein oder Proteine mit einer Polyglutaminsequenz wie Huntingtin, oder Fragmente oder Derivate dieser Proteine enthalten, dienen.

Insbesondere ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Untersuchung subzellulärer Partikel, insbesondere auch zur phänotypischen Analyse viraler Partikel oder zur Analyse von Nukleinsäuren mittels Antisensesonden geeignet.

Neben der erhöhten Spezifität in der Detektion von Zielmolekülen hat das erfindungsgemäße Verfahren ein zusätzliches Potential:

Für im wesentlichen jedes detektierte Zielmolekül kann separat die relative Markierungsintensität der verschiedenfarbigen Sonden gemessen werden. Im Gegensatz zur absoluten Intensität der Einzelfarben ist dieses Markierungsverhältnis bei nahezu deckungsgleichen Volumenelementen für die verschiedenen separat detektierten Farben weitgehend unabhängig von der Route, die das jeweilige Zielmolekül durch das Detektionsvolumen nimmt. Die simultane Messung mehrerer unterschiedlicher Sonden an einem Einzelpartikel kann somit durch Bezug der Messwerte aufeinander als interner Standard auf Einzelpartikelebene aufgefasst werden. Bei einer homogenen Population an Zielmolekülen ist daher das Markierungsverhältnis für alle detektierten Partikel ähnlich, in einem zweidimensionalen Intensitätshistogramm streut daher das Zielmolekül spezifische Signale um eine Gerade, deren Steilheit von der relativen Bindung der zwei analysierten Sondenmoleküle bestimmt wird. Bei der Analyse eines anderen Typs von Zielmolekül mit abweichenden Bindungseigenschaften ergibt sich entsprechend ein anderes Markierungsverhältnis (Figur 1). Die relative Bindung zweier verschiedener Sonden kann somit leicht und schnell in einem homogenen Assay unter definierten Pufferbedingungen ermittelt werden und liefert unter geeigneten Bedingungen einen jeweils charakteristischen Wert für verschiedene Zielmolekültypen.

Im Fall der Prionkrankheiten ist aufgrund des Vorkommens verschiedener, in ihrem biologischen Verhalten unterscheidbarer Erregerstämme auch in Wirten mit identischer PrP-Primärstruktur davon auszugehen, dass verschiedene pathologische Formen von PrP^{Sc} existieren, die sich offenbar nur in ihrer Konformation oder Aggregatstruktur unterscheiden. Durch konformationsabhängig unterschiedliche Antikörperbindung sollten diese verschiedenen Formen oder Prion-Stämme bei Verfügbarkeit geeigneter monoklonaler Antikörper grundsätzlich unterscheidbar sein. So findet sich bei der Untersuchung von gereinigten PrP^{Sc}-Aggregaten von Creutzfeldt-Jakob-Patienten in Abhängigkeit davon, ob es sich um pathologisches Prionprotein vom Typ 1 oder Typ 2 handelt, ein unterschiedliches Bindungsverhalten der monoklonalen Antikörper 12F10 und Pri917. Sowohl beim Menschen als auch im Tierreich ist die Erregerstamm-Typisierung von großer epidemiologischer Bedeutung. Hierbei ist von

besonderer Relevanz die Identifizierung des BSE-Erregerstammes nach Übertragung auf andere Spezies. Insbesondere beim Menschen dürfte darüber hinaus eine Erregertypisierung auch prognostisch und eventuell therapeutisch bedeutsam sein.

Die Typisierung über relative Bindung verschiedener Sondenmoleküle mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens hat dabei mehrere konzeptionelle Vorteile:

1) Da jedes Zielmolekül separat analysiert wird, können grundsätzlich auch Mischungen verschiedener Zielmoleküle untersucht und das Mengenverhältnis der Komponenten bestimmt werden. Dieses unterscheidet das erfindungsgemäß vorgeschlagene Verfahren grundsätzlich von allen Verfahren, in denen Messwerte, die sich aus der Integration oder Mittelwertbildung von Messwerten über Zielmolekül-Ensembles ergeben, gewonnen werden.

2) Zur Typisierung genügen Sonden mit einer mäßig unterschiedlichen Affinität zu den verschiedenen Zielmolekültypen, eine Alles-oder-Nichts-Bindung ist nicht erforderlich.

3) Aus der Zugänglichkeit verschiedener, von unterschiedlichen Sondenmolekülen erkannter Epitope bei unterschiedlichen Typen/Erregerstämmen können Rückschlüsse auf die räumliche Struktur gezogen werden.

4) Da die relative Bindung der verschiedenen Sondenmoleküle durch simultane Messung dieser Sondenmoleküle auf einzelnen Zielmolekülen (Partikeln) bestimmt wird, wird dieses Bindungsverhältnis auch durch die Interaktion dieser Sondenmoleküle (z.B. sterische Kompetition) beeinflusst. Die simultane Messung in Anwesenheit der verschiedenen separat detektierbaren Sonden liefert daher mehr Information als es die separate Bestimmung zu verschiedenen Zeitpunkten, in verschiedenen Messvolumina oder separaten Messansätzen täte.

5) Es genügen geringe Mengen wenig konzentrierten Zielmoleküls, eine vorhergehende Reinigung ist nicht nötig, wodurch das Zielmolekül auch unter nahezu nativen physiologischen Bedingungen analysiert werden kann.

6) Gegenüber etablierten Verfahren zur PrP^{Sc} Typisierung (Western Blot) erlaubt das Verfahren einen schnellen Test in einem homogenen Assay, so dass ein große Probenzahl analysiert werden kann (diagnostisches oder Wirkstoff-Screening).

Das erfindungsgemäße Verfahren ist grundsätzlich nicht auf die oben beschriebene konkrete Anwendung im Bereich der Typisierung verschiedener Prion-Stämme beschränkt. Grundsätzlich ist eine Analyse verschiedenster bevorzugt subzellulärer Partikel möglich, die sich mit insbesondere fluoreszenzmarkierten Sonden markieren lassen. Die Vorteile, die oben aufgeführt wurden, gelten hier analog. Insbesondere sind folgende Einsatzfelder zu nennen:

a) Im Bereich der Prionkrankheiten ist neben der Erregerstammtypisierung die relative Bindung von PrP^{c} verschiedener Spezies an Prionproteinaggregate einer bestimmten Spezies untersuchbar, was eine Abschätzung der jeweiligen Speziesbariere für eine Krankheitsübertragung ermöglicht.

b) Andere (neuro-)degenerative Krankheiten mit Bildung pathologischer Aggregate wie insbesondere der Morbus Alzheimer sind analog untersuchbar. Auch hier werden Subtypen pathologischer Aggregate mit potentiell unterschiedlicher diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Bedeutung erkennbar. Es sei hier insbesondere die Analyse von Aggregaten genannt, die als mindestens eine Komponente Prionprotein, APP, Tau, Synuclein oder Proteine mit einer Polyglutaminsequenz wie z.B. Huntingtin, oder Fragmente oder Derivate (z.B. phosphorylierte oder glykosylierte Derivate) dieser Proteine enthalten.

c) Andere subzelluläre Partikel werden analog untersuchbar, bis hin zur phänotypischen Analyse viraler Partikel.

Die Anlagerung mehrerer Sonden an ein pathologisches Aggregat lässt sich zum Nachweis einzelner Aggregate, oder allgemeiner Zielmoleküle in Lösung nutzen. Die Entwicklung dieses Prinzips zu einem hochempfindlichen Detektionsverfahren und dessen beispielhafte Anwendung in der Liquordiagnostik der

Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (CJD) und von Morbus Alzheimer sind im Folgenden ausführlich dargestellt.

Theoretische Grundlagen

Korrelationsanalyse mehrerer Komponenten

Liegen in einer Lösung mehrere fluoreszente Komponenten *i* nebeneinander vor, so gehen diese anteilig in die Korrelationsfunktion ein [15]. Für den Fall, dass die Komponenten der Lösung eine unterschiedliche Quanteneffizienz der Fluoreszenz besitzen, also verschieden "hell" leuchten, sollte die unterschiedliche Detektionswahrscheinlichkeit der Moleküle berücksichtigt werden. Man definiert daher eine relative Quantenausbeute $\alpha_i \equiv Q_i/Q_1$. Die Korrelationsfunktion lautet dann [27]:

$$G(\tau) = \frac{1}{N_{ges}} \sum_{i=1}^{n} x_i \alpha_1^2 diff_i \qquad (1)$$

mit

$$N_{ges} = \sum N_i \; ; \; x_i = C_i / \sum C_i$$

$$diff_i \equiv \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,i}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\omega_0^2}{z_0^2} \frac{\tau}{\tau_{D,i}}\right)^{-1/2}$$

und C_i als Konzentration der Komponente *i*. Es ist zu beachten, dass stark fluoreszierende Moleküle durch den quadratischen Einfluss von α_i in der Korrelationsfunktion gegenüber ihrem Anteil an der Konzentration überrepräsentiert sind. Die effektive Leuchtkraft eines Moleküls, das viele Fluorophore trägt, ist sehr viel höher als die von Molekülen, die nur ein Fluorophor tragen. Im Falle der Aggregation kann daher der Durchtritt eines einzelnen hochmarkierten Aggregats durch den Fokus die Korrelationskurve völlig dominieren.

Zweifarben-Kreuzkorrelationsanalyse

Bei der Analyse eines Autokorrelationssignals stellt sich oft das Problem der Überlagerung vieler dynamischer Prozesse, z.B. durch verschiedene diffundierende Molekülspezies. Unterscheiden sich die Moleküle nicht wesentlich in ihrer

Größe oder liegen mehr als zwei Komponenten in Lösung vor, können die Signalanteile der einzelnen Komponenten nicht mehr sicher bestimmt werden [25].

Eine Lösung dieses Problems bietet die in [3] entwickelte und von Petra Schwille sowohl theoretisch als auch experimentell ausgearbeitete Technik der Zweifarben-Kreuzkorrelationsanalyse. Die Technik ist in [23] und [24] ausführlich beschrieben. In der Messung wird die Fluktuation im Signal zweier Fluorophore untersucht, deren Emissionsspektren möglichst wenig überlappen. Werden zwei Molekülspezies mit diesen Farbstoffen markiert, so kann die Interaktion der markierten Moleküle durch Kreuzkorrelation der Fluktuation beider Fluoreszenzsignale verfolgt werden. Ebenso können gleichartige Moleküle mit verschiedenen Markern versehen werden, um ihre Wechselwirkung miteinander oder mit einem dritten Partner zu charakterisieren. Wenn die Molekülspezies *i* und *j* aneinander oder an einen gemeinsamen Interaktionspartner binden, entsteht eine Molekülspezies *ij*, die beide Fluorophore trägt. Allein diese Komponente geht in das Kreuzkorrelationssignal ein. Sie wurde als Referenz bei der Detektion pathologischer Aggregate verwendet. Das Fluoreszenzsignal $F_i(t)$ wird mit $F_j(t + \tau)$ im selben Messvolumen verglichen. Für das normierte Kreuzkorrelationssignal $G_{ij}(\tau)$ gilt dann:

$$G_{ij}(\tau) = \frac{\langle \delta F_i(t) \delta F_j(t+\tau) \rangle}{\langle F_i(t) \rangle \langle F_j(t) \rangle} \qquad (2)$$

Für eine Farbe *i* ergibt sich analog Gl. 7 die Fluktuation des Fluoreszenzsignals aus der Summe der Fluktuationen aller Moleküle, die das Fluorophor *i* tragen. Besitzen die Molekülspezies n_i unterschiedliche relative Helligkeiten, sollte wiederum die Emissionscharakteristik $W_n(\vec{r})$ bezüglich der jeweiligen Anregungsfarbe berücksichtigt werden:

$$\delta F_i(t) = \sum_n \int_V W_{n_i}(\vec{r}) \delta C_n(\vec{r}, t) d\vec{r} \qquad (3)$$

Im Fall eines Aggregationsprozesses enthält das System viele verschiedene Molekülspezies, die eine unterschiedliche Anzahl an Fluorophoren tragen und deren Quantenausbeute durch die unterschiedliche molekulare Umgebung wiederum in verschiedenem Maße verringert werden kann. Der Fluktuationsterm kann durch die Vielzahl verschiedener Emissionscharakteristika $W(\vec{r})$ sehr komplex werden. Nimmt man im Falle kleiner Aggregate an, dass der Aggregationsprozess die Emission der Farbstoffe nicht wesentlich ändert, so bleibt der Nenner von Gl. 2 konstant und man erhält:

$$G_{ij} = const \frac{\sum_m \sum_n mn\langle N_{mn}\rangle diff_{mn}}{\langle N_{i,0}\rangle\langle N_{j,0}\rangle} \qquad (4)$$

wobei *diff* analog Gl. 1 definiert ist. N_{mn} ist die Anzahl der Aggregate, die m Monomere der Spezies i und n Monomere der Spezies j enthalten, sowie $N_{i,0}$ und $N_{j,0}$ die Anzahl freier Monomere i und j im Messvolumen zu Beginn des Experiments. Auch dieser Ausdruck ist im Falle heterogener Aggregate noch zu komplex, um eine quantitative Auswertung zu erlauben.

Im Falle einer einfachen Dimerisierung, die bei niedrigen Konzentrationen der initiale Schritt jedes Aggregationsprozesses sein sollte, reduziert sich der Ausdruck für G_{ij} auf eine einzelne Diffusionskomponente mit der Zeitkonstante τ_{ij}:

$$\begin{aligned} G_{ij}(\tau) &= const\langle N_{ij}\rangle diff_{ij} \\ G_{ij}(0) &\propto \langle N_{ij}\rangle \end{aligned} \qquad (5)$$

Zwischen der inversen Korrelationsamplitude $G(\tau)^{-1}$ und τ erhält man damit einen linearen Zusammenhang:

$$G(\tau)^{-1} = \frac{N}{\tau_{ij}} \cdot \tau + N \qquad (6)$$

Anhand der Gleichungen 4 und 5 sind unmittelbar mehrere Merkmale der Kreuzkorrelationsfunktion ersichtlich, die sie zur Untersuchung von Bindungsprozessen attraktiv machen:

1. Allein die Diffusionskomponente der doppelt markierten Moleküle steht im Nenner von G_{ij}. Auch in Mischungen mit Monomeren und Homo-Multimeren kann sie isoliert charakterisiert werden.

2. Unter der Voraussetzung, dass sich die Gesamtfluoreszenz im Laufe der Reaktion nicht ändert, ist die Amplitude $G(0)$ unmittelbar proportional zur Konzentration der doppelt markierten Moleküle. Die Kinetik eines Bindungsprozesses oder Spaltungsprozesses kann damit auf einfache Weise verfolgt werden [24], [6].

3. Da der Übergang zweier Fluoreszenzphotonen in den Triplettzustand auch dann voneinander unabhängig ist, wenn diese an das selbe Molekül gebunden sind, enthält das Kreuzkorrelationssignal keinen Triplettanteil [24]. Dies ermöglicht eine Anpassung der Messwerte mit einer geringeren Zahl freier Parameter und damit eine gute Anpassung auch im Falle eines schlechteren Signal/Rausch-Verhältnisses.

Intensitätsverteilung des Fluoreszenzsignals

Ein weiterer Parameter, der neben der Diffusionszeit zur Charakterisierung eines Moleküls genutzt werden kann, ist die spezifische Helligkeit des Moleküls. Eine Analyse der Fluoreszenzintensität auf der Basis höherer Moden der Korrelationsfunktion wurde 1990 von Qian vorgenommen [18]. Ein gutes experimentelles Maß der spezifischen Helligkeit ist die Zählrate der Fluoreszenzphotonen je Molekül (cpms). Bei konstanter Anregung ist diese Größe proportional zum Produkt Q von Fluoreszenzquantenausbeute und Absorptionsquerschnitt des Moleküls [5]. Sie ist damit charakteristisch für das Molekül. Im Falle eines Aggregationsprozesses oder auch der Detektion von Aggregaten, die bereits in der Lösung vorliegen, erzeugt die Bindung vieler Monomere mit identischen Fluorophoren die größere Helligkeit des Aggregates. Lässt man Quenching- und Verdeckungseffekte, die die Quantenausbeute der Fluorophore im Aggregat erniedrigen können, außer Acht, wäre die relative Helligkeit damit proportional zur Zahl der gebundenen Fluorophore. In der Praxis erlaubt diese Überlegung jedoch nur eine sehr grobe Abschätzung der Zahl der gebundenen Fluorophore.

Die Intensitätsverteilung der Fluoreszenzphotonen ließe sich bei bekannter Detektionsfunktion $W(\vec{r})$ des Moleküls berechnen. Sie ist nach Gleichung 7 gegeben durch

$$W(\vec{r}) = I_a(\vec{r})\, CEF(\vec{r})\, Q \qquad (7)$$

mit $I_a(r)$ als Anregungsprofil und $CEF(r)$ als Einsammelfunktion des optischen Aufbaus. Für die analytische Lösung der Korrelationsfunktion wurde $W(r)$ durch ein dreidimensionales Gaußprofil angenähert [21]. Die Intensitätsverteilung der Fluoreszenzphotonen zeigt jedoch merkliche Abweichungen von dieser Näherung [5]. Setzt man eine bekannte Detektionsfunktion $W(\vec{r})$ voraus, lässt sich die Verteilung der Fluoreszenzphotonen in einem infinitesimalen Volumen dVi mit konstanter Detektionsfunktion W_i berechnen. Sie ist das Produkt zweier Poissonverteilungen, und zwar der Verteilung der Anzahl N der Moleküle im Volumen dV_i und der Verteilung der Zahl der Photonen n, die von einem Molekül im Volumen dV_i detektiert werden [5].

$$P_i(n) = \sum_{N=0}^{\infty} N \frac{\langle N \rangle^N}{N!} e^{-\langle N \rangle} \cdot \frac{\langle n \rangle^n}{n!} e^{-\langle n \rangle} \qquad (8)$$

mit $\langle N \rangle = \int C dV_i$ und $\langle n \rangle = QW_iT$

wobei C die Konzentration der Moleküle und T die Binweite, d.h. die Länge der Zeitintervalle ist, in denen die Photonen summiert werden. Dieser Ansatz macht zwei Annahmen:

1. Die Moleküle sind statisch, daher muss $T \ll \tau_D$ sein.
2. Die Detektionsfunktion eines Moleküls ist das Produkt einer allgemeinen Detektionsfunktion $W(\vec{r})$ und einer molekülspezifischen Konstante Q. Bei der Aggregatdetektion ist die erste Annahme nur für den Fall der stationären Messung erfüllt. Ansonsten wurde eine längere Binweite gewählt, um das Verhältnis zwischen Aggregatsignal und Sondenhintergrund zu maximieren. Die zweite Annahme ist im Falle einzelner Chromophore nur bedingt erfüllt, da der Übergang in den strahlungslosen Triplettzustand die Quantenausbeute verringert. Dieser Übergang ist abhängig von der Anregungsinten-

sität und damit vom Anregungsprofil. Diese Einschränkung kann jedoch bei multichromophoren Molekülen vernachlässigt werden.

Wenn keine genaue Charakterisierung der Intensitätsverteilung gefordert ist, sondern lediglich eine sehr intensiv fluoreszierende Komponente über einen Schwellenwert abgetrennt werden soll, lässt sich die Verteilung der detektierten Photonen / Bin *n* empirisch durch eine "schiefe" Normalverteilung anpassen. Als Anpassungsmodell kann dabei eine Log-Normalverteilung dienen.

$$P(n) = \frac{1}{n\sqrt{2\pi\sigma^2}}\, e^{-(\log n-\nu)^2/2\sigma^2} \qquad (9)$$

Dabei gibt ν den Erwartungswert und σ, die Standardabweichung der Verteilung an.

Materialien

Die Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien, Chromatographiematerialien und Proteinen sind im Folgenden aufgeführt. Alle verwendeten Chemikalien besaßen die höchste erhältliche Reinheit.

Firma	**Material**
Calbiochem, Nottingham (UK)	NP-40 Detergent 10%
MoBiTec, Göttingen	Mikospinsäulen
Pharmacia, Freiburg	Sephadex G 75
	Sephadex G 15
Sigma, St. Louis, MO (USA)	Dulbecco's PBS
	SDS
	Tween20
VitroCom Inc., Mountain Lakes, NJ (USA)	Glaskapillaren (50 x 2.6 x 0.2 mm)
Wiederholdt & Hutter	Deutscher Wappenlack

Firma	Material
Fluoreszenzfarbstoffe	
Amersham, Arlington Heights, IL, (USA)	Cy5 Labeling Kit
Molecular Probes, Eugene, OR (USA)	Alexa Fluor 488 Labeling Kit FluoSpheres (505/515) Oregon Green 488 Labeling Kit
Proteine	
Bachem AG	Amyloid ß-Protein (1-42)
Sigman, St. Louis, MO (USA)	Proteinase K bovines Serum-Albumin (BSA)

Puffer und Stammlösungen

Die folgende Liste enthält alle verwendeten Puffer und Stammlösungen, die mit demineralisiertem Wasser angesetzt worden sind, sowie ihre Abkürzungen. Pufferlösungen wurden vor Verwendung durch einen Membranfliter (0.22 µm, Millipore) sterilfiltriert.

Abkürzung	Zusammensetzung		
AP	SDS		3% (w/v)
	Tris-HCl	pH 6.8	60 mM
AS	NaCl		100mM
	KAc/HAc	pH 5.0	10 mM
B-Puffer	Na_2HPO_4/NaH_2PO_4	pH 7.0	20 mM
ErPuffer	Glycin-HCl	pH 2.7	100 mM
N-Puffer	Tris-HCl	pH 7.0	1 M
NaPi	Na_2HPO_4/NaH_2PO_4	pH 7.2	10 mM

NaP2	Na_2HPO_4	pH 8.4	
0.5 M			
NaC	Na_2CO_3	pH 9.2	1 M
Lyse-Puffer	NaCl		100mM
	EDTA		10 mM
	NP-40		0.5% (v/v)
	Na-Desoxycholat		0.5% (w/v)
	Tris-HCl	pH 7.4	10 mM
PBS	NaCl		100mM
	Na_2HPO_4/NaH_2PO_4	pH 7.2	10 mM
PBSN	NaCl		100mM
	Na_2HPO_4/NaH_2PO_4	pH 7.2	10 mM
	NP-40		0.1% (w/v)
PBSS	NaCl		100mM
	Na_2HPO_4/NaH_2PO_4	pH 7.2	10 mM
	SDS		0.2% (w/v)
RIPA	NaCl		00mM
	EDTA		1 mm
	NP-40		1% (v/v)
	Na-Desoxycholat		0.5% (w/v)
	Tris-HCl	pH 7.4	10 mM

Prionprotein

rPrP Als Modellsystem zur Untersuchung der Aggregation des Prionproteins wurde vornehmlich ein in *E. coli* erzeugtes rekombinantes Prionprotein verwendet, das homolog zu den Aminosäuren 90-231 des Prionproteins des syrischen Hamsters war. Es entsprach damit dem proteaseresistenten Kern des pathologischen PrPII, war anders als das natürliche Protein jedoch nicht glyko-

syliert und besaß keinen Membrananker. Ansonsten entsprach seine Struktur den Aminosäuren 90-231. Das Protein wurde in einem STII TIR Vektor im *E. coli.* Stamm 27C7 exprimiert wie von Mehlhorn beschrieben [13]. Das Protein lag als Stammlösung einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS + 0.2% SDS (w/v) vor.

Prion Rods Die Präparation des aggregierten PrP (27-30) aus syrischen Hamstern, den sogenannten *prion rods,* ist in [17] beschrieben. Das Protein lag sonifiziert in einer Konzentration von 30 µg/ml in NaPi + 0.2% SDS (w/v) vor.

Humanes PrP^{sc} Die unterschiedlichen Subtypen der Creutzfeldt Jakob Erkrankung sind anhand dieses Materials durch Parchi et al. (1997) durch konventionelle Methoden anhand der Straintypen (1/2) und des Polymorphismus am Codon 129 des humanen Prionproteins differenziert worden. Dasselbe Material wurde zur direkten Differenzierung der PrP^{sc} Typen I und II durch SIFT Messung verwendet.

Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene spezifische Antikörper gegen Epitope des Prionproteins und des Aß (1-42)-Peptids verwendet. Sie sind im Folgenden aufgeführt.

Der Antikörper **Pri917** ist gegen die Aminosäuren (214-230) des menschlichen PrP gerichtet.

Der Antikörper **3F4** ist gegen die AS (109-112) des Hamster-PrP gerichtet und besitzt eine etwas schwächere Affinität zu humanem PrP Er wurde gemäß [7] hergestellt.

Der Antikörper **15B3** erkennt spezifisch die aggregierte PrP^{sc} Isoform. Er wurde von der Firma Prionics (Schweiz) hergestellt.

Der Antikörper **12F10,** ist gegen AS (142-160) des humanen PrP gerichtet (Krasemann [8]). Er wurde über die Firma IBA, Heiligenstadt bezogen.

Der A/3-spezifische Antikörper **6E10** ist gegen den N-Terminus der Aß-Peptide (1-17) gerichtet.

Im Folgenden sind verwendete Antikörper aufgeführt:

Bezeichnung	**Antigen**	**Hersteller**
MAMI (IgM)	ß-Amyloid(1-40)	BMA Biomedicals, Augst (CH)
Anti-IL8 (IgGl)	humanes IL-8	Sigma BioSciences, St. Louis, MO (USA)
Anti-A40 (Se rum)	ß-Amyloid 1-40	Sigma BioSciences, St. Louis, MO (USA)
pAB42 (polyklonaler AK)	ß-Amyloid 1-42	Oncogene Cambridge MA (USA)

Liquorproben

Für die diagnostsche Untersuchung wurde Spinalliquor von Patienten verwendet [30,31]. Die Entnahme im Rahmen der Studie erfolgte unter Zustimmung der Patienten.

Für die CJD Diagnostik wurde Spinalliquor von 37 Patienten verwendet, die an neurodegenerativen Erkrankungen litten. Darunter befanden sich 11 neuropathologisch gesicherte Fälle, sowie 13 Fälle, deren Diagnose nach epidemiologischen Kriterien [28] als wahrscheinlich galt.

Zur Alzheimer Diagnostik wurde Spinalliquor von 6 Patienten, deren Diagnose der Alzheimer Demenz anhand biochemischer (Konzentration Aß 42 / 40 / 38), neurologischer sowie psychologischer Kriterien gesichert war, sowie von 12 Kontrollpatienten verwendet. Die Liquorproben wurden im Rahmen der neurologischen Routinediagnostik gewonnen. Die Proben der klinischen Studien sind hinsichtlich ihrer Vorbehandlung nicht standardisiert. Sie wurden nach der Abnahme bei -70°C gelagert und für biochemische Untersuchungen mehrmals aufgetaut.

Spinalliquor von 5 AD Patienten sowie 4 Kontrollpatienten wurde eigens für die liquordiagnostische Anwendung gewonnen.

Messaufbau der FCS

Als Basis für die Aggregationsmessungen diente ein Zweifarben-Kreuzkorrelations-FCS-Aufbau. Theoretisches Konzept und praktischer Aufbau sind von Schwille in [23] ausführlich beschrieben. Auf Grundlage dieses Aufbaus wurde ein Prototyp entwickelt, an dem die Aggregationsmessungen durchgeführt wurden. Für die SIFT-Messungen wurde der Aufbau um eine Ansteuerung zum Scannen der Probe und um eine Messkarte zur Intensitätsanalyse erweitert.

Der Messaufbau ist in Figur 3 schematisch dargestellt. Der Strahl eines Ar-Ionen Lasers (488 nm) und eines He-Ne Lasers (633 nm) werden über eine *single-mode* Glasfaser, eine Aufweitungsoptik und einen doppelten Dichroiten parallel in den Strahlengang eingekoppelt und durch ein Mikroskopobjektiv (x40 bzw. x63) in der Messlösung fokussiert. Die Brennpunkte beider Strahlen bilden das offene Messvolumen der FCS. Die Apertur des Objektives wird vollständig ausgeleuchtet, so dass für den blauen Fokus ein Radius von 0.25 µm (x40) bzw. 0.19 µm (x63) resultiert. Die Figur der Foci ist nicht völlig ideal, der Radius des roten Brennpunktes ist um ca. 20% größer als der des grünen Fokus, die Mittelpunkte beider Foci weichen um ca. 50 nm voneinander ab. Der grüne Fokus liegt damit jedoch noch vollständig innerhalb des roten.

Das Fluoreszenzlicht wird über das Mikroskopobjektiv gesammelt und konfokal auf einem Pinhole abgebildet. Das Pinhole kann in Durchmesser, und in x-y-z-Achsen durch Schrittmotoren gesteuert werden. Das parallelisierte Fluoreszenzlicht wird über eine Dichroit/Filterkombination in rote und grüne Emmision gespalten und auf zwei AvalanchePhotodioden (APD) fokussiert. Die APD besitzen eine Detektionseffizienz von ca. 70% und erzeugen für jedes detektierte Photon einen TTL-Puls. Das TTL-Signal wird über eine Verstärkerweiche gleichzeitig an eine Hardwarekorrelatorkarte (ALV-5000, ALV, Langen) zur Korrelationsanalyse und an eine Multichannel-Scaler-Timer (MCS) Karte (MCD-2, FAST GmbH, Unterhaching bzw. C. Zeiss, Jena) zur Intensitätsanalyse des Signals weitergeleitet.

Bei den Messungen kamen zwei Objektiv/Pinhole Kombinationen zum Einsatz:

- Objektiv x40 / 1.2 N.A. (Zeiss) und 50 µm Pinhole
- Objektiv x63 / 1.2 N.A. (Olympus) und 30 µm Pinhole.

Wo nicht anders angegeben betrug die Leistung der Anregungslaser 57 µW (488 nm) bzw. 53 µW (633 nm).

Scanning

Zum Scannen der Probe wurde die Messlösung in eine Glaskapillare von 50 mm Länge, 0.18 mm Wandstärke und einem Innenquerschnitt von 2.6 x 0.2 mm gefüllt. Das Probenvolumen betrug dabei 20 µl. Die Enden der Messkapillare wurde durch einen Lack auf Kollophoniumbasis auf einem Objektglasträger befestigt und dabei gleichzeitig versiegelt.

Das Scannen der Messlösung wurde durch Ansteuerung des Positioniertisches des FCS-Messaufbaus (Märzhäuser, Wetzlar) über eine Makrosprache (WinBatch, Wilson Window Ware, Seattle WA, USA) realisiert. Innerhalb des Confocor Steuerprograms (C. Zeiss, Jena) wurde ein Feld von 2 x 20 Punkten definiert, deren Abstand entlang der Kapillarrichtung 20 mm und 10 µm quer zur Kapillare betrug. Die Punkte diese Feldes wurden so angesteuert, dass die Kapillare relativ zum Mikroskopobjektiv mäanderförmig mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s bewegt wurde.

Intensitätsanalyse

Sowohl Aufnahme der Spur der Fluoreszenzintensität als auch die Intensitätsanalyse erfolgten auf einem separaten Messrechner durch eine MCS-Karte (C. Zeiss, Jena). Histogramme der Fluoreszenzintensität wurden mit der Software Origin 6 (Microcal, Northampton, MA, USA) erstellt. Ein Programm zur automatisierten Erstellung von Intensitätshistogrammen wurde erstellt und uns zusammen mit einer Messkarte freundlicherweise durch die Fa. Zeiss zur Verfügung gestellt. Die Auswertung sowie die grafische Darstellung der Intensitätshistogramme erfolgte über Perl-Routinen.

Markierung des Prionproteins

Um den Einfluss des Fluorophors zu minimieren wurden bei allen Markierungsansätzen Bedingungen gewählt, die zu einer unvollständigen Markierung des Proteins führten, so dass maximal ein Farbstoffmolekül an ein Proteinmolekül gekoppelt wurde.

Zur Markierung des PrP mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cyanin5 (Cy5), bzw. Oregon Green488 oder Alexa488 wurde ein aminoreaktiver Succinimidylester des Farbstoffes an eine primäre Aminogruppe eines Lysins des Proteins gekoppelt. Ein Aliquot des Farbstoffes (ca. 100 µg) wurden in 50 µl DMSO gelöst. Jeweils 3 µl des Farbstoffs wurden zu 100 µl rPrP (90-231) (100 µg/ml) in NaP2 zugegeben und in der Dunkelheit 1 h bei RT gerührt. Mikrospinsäulen (Mobitec) mit Sephadex G-75 (Pharmacia) wurden mit 3 * 350 µl PBSS äquilibriert (Zentrifugation 1 min, 750 g). Nach der Reaktion wurde das Produkt von überschüssigem Farbstoff über zwei Mikrospinsäulen getrennt (Zentrifugation 3 min, 750 g).

Der Anteil markierter Moleküle betrug für PrP-Oregon Green 4% und für PrP-Cy5 14% unter Annahme eines Fluorophors/Proteinmolekül.

Markierung der Antikörper

Mikrospinsäulen (Mobitec) mit Sephadex G-15 (Pharmacia) wurden mit 3 * 350 Gel PBSN äquilibriert (Zentrifugieren 1 min, 750 g). 5-20 µl Antikörper (c = 0.1-1 mg/ml) wurden mit PBSN auf 30 µl aufgefüllt und über die Spinsäule in PBSN Puffer überführt (Zentrifugation 3 min, 750 g). Nach Zugabe von 3 µl NaC und 1.5 µl Cy5 bzw. 3 µl Oregon Green oder Alexa488 (2 µg/µl in DMSO) wurde ü.N. bei 4°C stehengelassen. Die markierten Antikörper wurden über eine Mikrospinsäule mit Sephadex G-75 (Pharmacia) gereinigt (3 min, 750 g), die mit PBSN äquilibriert war. Nach erneuter Elution mit 30 µl PBSN wurde eine zweite Fraktion markierter Antikörper erhalten. Konzentration des Antikörpers und Anteil an freiem Farbstoff (≤ 5%) wurden durch Autokorrelationsmessung in der FCS bestimmt.

Bestimmung des Markierungsverhältnisses

Die Proteinkonzentration wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm und einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer (Lambda 17, Perkin Elmer) bestimmt. Anhand des Absorptionsspektrums des freien Farbstoffes wurde zur Korrektur der Konzentration des markierten Proteins das Absorptionsverhältnis $\alpha = E^F_{280}/EF^F_{280}$ des Farbstoffs bestimmt (Alexa488, Oregon Green: E^F_{max} = 495 nm, Cy5: E^F_{max} = 650 nm). Die Konzentration des markierten Proteins c_p berechnet sich nach:

$$cP = E28o(1 - aEmax) \text{ ' } l(gll)\ 1\ 1/m\ [M] \qquad (10)$$

mit m als Molmasse des Proteins (g/mol). Die Konzentration des Fluorophors CF berechnet sich anhand des Extinktionskoeffizienten des Farbstoffs ε: $c_F = E^F_{max} \bullet \varepsilon$ (ε_{Oregon} = 7.0 . $10^4 M^{-1}\ cm^{-1}$, $\varepsilon_{Alexa488}$ = 7.1 • $10^4 M^{-1}\ cm^{-1}$, ε_{Cy5} = 2.5 10^5 $M^{-1}\ cm^{-1}$). Das Verhältnis von c_F/c_P bezeichnet die mittlere Zahl der Fluorophore pro Proteinmolekül.

Konzentrationsbestimmung durch FCS-Messung

Die Endkonzentration der fluoreszenzmarkierten Sonden, sowie der Anteil an freiem Farbstoff wurde durch Autokorrelationsmessungen bestimmt. Der Strukturparameter z_0/ω_0, sowie die Diffusionszeit des freien Farbstoffs wurde anhand von Autokorrelationsmessungen von Alexa488- und Cy5-Farbstofflösungen bestimmt. Das effektive Detektionsvolumen $V \approx 1.3 \times 4/3\pi\omega^2_0 z_0$ wurde anhand der Messung einer Rhodamin Green Lösung (D_{RG} = 2.8 • $10^{-10} m^2 s^{-1}$) über $\omega_0 = (4D\tau_D)^{-1/2}$ berechnet. Die Größe des Messvolumens betrug für das x40 Objektiv 0.4 fl (ω_0 = 0.25 µm, τ_D = 55 µs) und für das x63 Objektiv 0.2 fl (ω_0 = 0.19 µm, τ_D = 32 µs).

SIFT-Messungen

Für das "Scannen intensiv fluoreszierender Targetmoleküle" (SIFT), d.h. für die Messung am diagnostischen Modellsystem von CJD und AD wurden *prion rods* bzw. Aß-Aggregate in der angegebenen Konzentration in Liquor bzw. Puffer in einem silanisierten Probengefäß (G. Kisker, Mühlhausen) auf ein Volumen von 18 µl verdünnt. 2 µl einer Mischung fluoreszenzmarkierter Sonden in PBSN wurde zugegeben, so dass die Endkonzentration der Sonden 6 nM

(Antikörper) bzw. 10 nM (PrP) betrug. Für die Messung der Liquorproben von AD und CJD Patienten wurde 2 µl Sondenmix direkt zu 18 µl Liquor zugegeben. Eine Messkapillare wurde kontaminationsfrei mit der Probe befüllt und anschließend versiegelt. Die Messung erfolgte für 300 s bzw. 600 s bei 22°C mit einer Scangeschwindigkeit von 1 mm/s. Kontaminiertes Material wurde durch Autoklavieren (2 h, 140°C) oder Behandlung mit 2 M NaOH (min. 2 h) dekontaminiert.

Aß-Aggregate

Aß Peptid (1-42) wurden in lyophylisierter Form von der Firma Bachem Feinchemikalien (Heidelberg) bezogen. Zur Erzeugung von voraggregiertem Aß (1-42) wurde das Peptid in DMSO gelöst (c = 5 mg//ml), auf eine Konzentration von 10 µM in AS-Puffer verdünnt, und 2 H bei 22°C inkubiert. Aliquots des Aggregationszusatzes wurden in PBSN auf die angegebene Konzentration verdünnt.

Für die Adsorptionsmessung wurde aggregiertes Aß (1-42) zunächst auf 10 µM in PBS verdünnt. Aliquots wurden in den untersuchten Medien 1:10 verdünnt, mit Antikörpermix versetzt (6E10-Cy5, pAB42-Alexa488, c = 6 nM), in die Messkapillare gefüllt und versiegelt. Messung und Lagerung erfolgte bei 22°C im SIFT-Aufbau (Messzeit 300s, Binnweite 500 µs, Schwelle 8 .I_{max}).

Aufreinigung von Antikörpern

Antikörper 12F10 wurde über Protein G Affinitätschromatographie (MAbTrap G II, Pharmacia) aus serumfreiem Zellkulturüberstand aufgereinigt. Die Säule wurde mit 5ml bidest. H_20 gespült und mit 3 ml B-Puffer equilibirert. 15 ml Kulturüberstand wurden mit 15 ml B-Puffer versetzt und mittels einer sterilen Kunststoffspritze durch einen Membranfilter (0.45 µm, Millipore) auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 3 ml B-Puffer gespült, bis die Absorption (E_{280nm}) des Durchlaufs auf den Wert des Puffers abgesunken war. Es wurde mit 4 ml E-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in 10 Fraktionen aufgefangen, in denen jeweils 20 µl N-Puffer vorgelegt waren. Der Antikörper wurde in Fraktion 3 (400 µl) eluiert. Durch Absorptionsmessung wurde die Konzentration auf

350 mg/ml bestimmt. Es wurden 0.1% (v/v) NP-40 und 0.005% NaN_3 zugegeben und das Produkt bei -20°C gelagert.

Western Blot

Zur Konzentrationsbestimmung durch *Western blot* wurden *prion rods* in Liquor von Patienten ohne Anzeichen neurodegenerativer Erkrankungen verdünnt. Scrapie-infiziertes Hamsterhirn (Stamm 263 K) wurde mit 9 Teilen Lyse-Puffer homogenisiert und 30 min bei 37°C mit Proteinase K (100 µg/ml) inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 5 mM PMSF und Aufkochen in Auftragpuffer gestoppt. 10 µl wurden auf einem 12.5% SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresegel getrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (0.45 µm, Bio-Rad, CA) wurde das PrP durch Inkubation mit 3F4 als Primär-Antikörper und an alkalische Phosphatase gekoppeltem Ziege-anti-Maus Sekundär-Antikörper detektiert. Die Phosphataseaktivität wurde durch das CDP-Star ChemiluminiszenzSystem (Tropix Inc., Bedford MA) auf Hyperfilm ECL (Amersham, IL) sichtbar gemacht wie von den Herstellern angegeben. Der Nachweis von rPrP erfolgte analog, jedoch ohne PK-Verdau. Wo erforderlich, wurde das PA-Gel anschließend mit Coomassie Blau angefärbt (30 min, RT).

Entwicklung eines liquordiagnostischen Verfahrens für CJD und Morbus Alzheimer

Die Aggregation unter Umwandlung der Sekundärstruktur in eine stärker hydrophobe Konformation ist ein grundlegendes Charakteristikum des Prionproteins. Wie auch im Fall der Alzheimerschen Erkrankung, die zur Bildung pathologischer Aggregate der Aß-Peptide führt, kann der Nachweis aggregierten Proteins die Basis eines diagnostischen Tests bilden. Zu diesem Zweck ist es wünschenswert einzelne pathologische Aggregate nachzuweisen.

Anlagerung an Aggregationskeime

Durch Zugabe von monomeren fluoreszenzmarkiertem PrP zu einer Lösung von multimeren Aggregaten kann der Anlagerungsprozess der Monomere sichtbar gemacht werden. Auch im Laufe der *de-novo*-Aggregation traten zunehmend Fluoreszenzpeaks auf, die einzelnen multimeren Aggregaten des

Prionproteins mit einer großen Zahl von gebundenen Farbstoffen zuzuordnen waren. Der Durchtritt solcher Aggregate durch das Fokalvolumen erzeugt einen Schauer von Fluoreszenzphotonen, im Folgenden kurz Burst genannt, durch den die Aggregate unmittelbar nachgewiesen werden können (s. Fig. 4).

Während die Selbstaggregation des Prionproteins im Konzentrationsbereich, der für die FCS relevant ist, jedoch erst im Zeitraum ≥ 30 min zu einer detektierbaren Menge an Multimeren führte, erfolgte die Anlagerung an präexistente Aggregate bereits innerhalb der Probenvorbereitungszeit, d.h. innerhalb von Minuten, quantitativ. Im weiteren Messverlauf blieb die Zahl der detektierten Aggregate pro Zeiteinheit konstant (Fig. 4 unten).

Auf der Basis dieser Ergebnisse boten sich folgende Strategien zur Markierung aggregierter Zielmoleküle an:

1. Koaggregation homologer fluoreszenter Monomere (PrP oder Aß)

2. Koaggregation heterologer fluoreszenzmarkierter Monomere

3. Bindung spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper

4. gemischter Ansatz aus Monomeren und Antikörper-Sonden

Die Markierung kann sowohl mit einer als auch mit zwei verschiedenen Sondenmolekülen erfolgen, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Markierungsstrategie bestimmt das Analyseverfahren, mit dem das Signal der fluoreszenzmarkierten Aggregate detektiert und quantifiziert werden kann. Die Entwicklung eines diagnostischen Systems für Prionkrankheiten und für Morbus Alzheimer kann dabei von der selben Grundidee, der Anlagerung von Sonden an einen Aggregationskeim, ausgehen. Seine Entwicklung ist im Folgenden dargestellt.

Abtrennung des Signals der Aggregate

Durch die klassische Korrelationsanalyse der Fluktuation des Fluoreszenzsignals kann die Diffusionsbewegung einzelner Moleküle quantitativ ausgewertet werden. Es wird dabei aus einer Vielzahl von Moleküldurchtritten die mittlere Fluktuationszeit bestimmt. Wenn während einer Einzelmessung nur wenige

Durchtritte von hochmarkierten Aggregaten detektiert werden, hängt die gemessene Durchtrittszeit nicht nur von der Aggregatgröße, sondern auch entscheidend vom Weg der einzelnen Partikel durch das Messvolumen ab. Die Aggregatgröße kann daher anhand der Durchtrittszeit nur abgeschätzt werden.

Bei einer Sondenkonzentration von 10 nM liegen die freien Sonden gegenüber den Aggregaten 10^3 bis 10^6 fach im Überschuss vor. Figur 5 zeigt den Durchtritt eines einzelnen Aggregates von rekombinantem Prionprotein, das mit einer Sonde in der Autokorrelations-FCS beziehungsweise mit zwei unterschiedlich markierten Sonden in der Kreuzkorrelations-FCS detektiert wurde. Der Anteil des Aggregats betrug < 10% des Autokorrelationssignals. Durch heterologe Detektion mittels einer Kombination von grün markiertem rPrP als einer und einem aggregatspezifischem PrP Antikörper (15B3) als anderer Sonde konnte das Signal multimerer Aggregate vollständig von dem Signal mono- und oligomerer PrP-Moleküle getrennt werden (s. Fig. 5 links). Es wurden Durchtrittszeiten der Aggregate von 3-50 ms bestimmt. Die mittlere Diffusionszeit entspricht einem Molekulargewicht von mehreren MDa.

Die Intensität der markierten Zielmoleküle liegt im Mittel 20 bis 50-fach über der Intensität der freien Sondenmoleküle. Dies entspricht demnach der Mindestanzahl von Sondenmolekülen, die an ein Aggregat gebunden sind. Da der Verlauf der Fluoreszenzintensität der Aggregation auf ein Quenching der Monomere im gebundenen Zustand schließen lässt, liegt die tatsächliche Zahl der gebundenen Sonden zumindest bei der Verwendung von Monomeren vermutlich höher. Durch die große Zahl an gebundenen Fluorophoren lassen sich einzelne Moleküldurchtritte unmittelbar nachweisen.

Jedoch sind bei einer Konzentration der Aggregate im sub-picomolaren Bereich auf diese Weise nur wenige Zielmoleküle in einer Probe zu detektieren. Für ein 1000-mer in femtomolarer Konzentration ergibt sich bei einem Fokusdurchmesser von 0.4 µm eine Eintrittsfrequenz von $0.5 \cdot 10^{-3} s^{-1}$, was etwa zwei Teilchen je Stunde entspricht [3]. Zum limitierenden Faktor wird somit die Zahl der Durchtritte von Aggregaten durch den Messfokus, die wiederum durch die langsame Diffusion der Aggregate begrenzt wird.

Mit der Fluoreszenzintensität und der Kreuzkorrelation stehen somit zwei Parameter zur Verfügung, mit der einzelne Zielmoleküle auch bei einem hohen Überschuss freier Sonden detektiert werden können.

Bei Experimenten zum Nachweis von pathologischen Aggregaten des Prionproteins im Liquor von Creutzfeldt-Jakob Patienten wurde die Zahl der markierten Aggregate zunächst direkt aus der Zahl der Signalspitzen in der Intensitätsspur des Fluoreszenzsignals bestimmt. Als Sonde wurde hier solubilisiertes Prionprotein verwendet, das aus dem Hirnmaterial von Scrapie-infizierten Hamstern stammte. Die PrP-Sonde war mit dem Fluorophor Cy2 markiert. Figur 4 zeigt einen Ausschnitt der Spur des Fluoreszenzsignals einer Messung des Liquors eines Creutzfeldt-Jakob Patienten im Einkanal-FCS-Aufbau.

Das Fluoreszenzsignal wurde durch die Software des FCS Geräts und parallel durch eine Mehrkanal-Zähler (MCS)-Karte aufgezeichnet. Zu erkennen sind mehrere Fluoreszenzspitzen, die den Durchtritt eines hochmarkierten Makromoleküls durch den Messfokus anzeigen. Zur Detektion demenzspezifischer Aggregate des Aß-Peptids im Spinalliquor von Alzheimerpatienten ist eine erfolgreiche Anwendung dieses Verfahrens beschrieben [16]. Im vorliegenden System ließ die geringe Zahl von Ereignissen und sondeninhärente Aggregate keine reproduzierbare Unterscheidung der Liquorproben von CJD Patienten und Kontrollpatienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu.

Quantitative Intensitätsanalyse

Die direkte Zählung von Peaks im Fluoreszenzsignal erlaubt ohne eine Quantifizierung eines Schwellwertes der Intensität nur eine relativ unzuverlässige Identifizierung markierter Zielmoleküle. Daher wurde eine einfache Form der Intensitätsanalyse entwickelt, die den Anteil an Fluoreszenzsignal hoher Intensität in einem Intensitäthistogramm darstellt, um so den Anteil des Peaksignals quantitativ zu bestimmen. Zu diesem Zweck wird das Signal des Photodetektors geteilt und die Fluoreszenzphotonen parallel zur Korrelationsanalyse in einer Zähler-Timer-Karte in Intervallen gleicher Länge (Bins) aufsummiert. Die Zahl der Zeitintervalle mit einer bestimmten Anzahl an de-

tektierten Fluoreszenzphotonen wird im Laufe der Messung *on-line* in einem Intensitätshistogramm dargestellt.

Die Intensitätsverteilung der freien Sondenmoleküle (Fig. 6 d) ist durch die homogene mittlere Diffusionszeit der Sondenmoleküle und die Zahl an Fluorophoren wohl definiert. Lagen in der Lösung neben freien Sonden auch Zielmoleküle vor, die eine große Zahl fluoreszenter Sonden gebunden hatten, so zeigte das Intensitätshistogramm einen Anteil von Messkanälen mit einer hohen Zahl detektierter Fluoreszenzphotonen (Fig. 6 b).

Die Verteilung der Fluoreszenzintensität entsteht durch die Konvolution der Fluktuation der Molekülzahl mit der Anregungs- und Detektionscharakteristik des Messaufbaus, der sogenannten *collection efficiency function* (CEF) [19]. Experimentell ließ sich die Intensitätsverteilung der Antikörper (3F4-Alexa488) gut durch eine Log-Normalverteilung anpassen (Fig. 7 a).

Die Komponente der markierten Aggregate war aufgrund der heterogenen Aggregatgröße weniger gut definiert. Wie Figur 7 b) zeigt, ließ sie sich durch einen einzelnen Verteilungsterm nur unvollkommen beschreiben. Sie könnte durch eine Überlagerung der Verteilungen für unterschiedliche Aggregatgrößen und Chromophorzahlen quantifiziert werden. Aufgrund des kleinen N der detektierten Aggregate erschien dies jedoch wenig praktikabel. Das Signal der Zielmoleküle wurde daher durch Setzen eines Schwellenwertes vom Signal der Sonden abgetrennt und quantifiziert. Durch dieses Verfahren geht ein Teil des Signals der Zielmoleküle verloren, da es mit der Verteilung der Sondenmoleküle überlappt. Je höher der Schwellenwert, desto höher ist naturgemäß der Anteil an Zielmolekülen, deren Signal unterhalb der Schwelle liegt und die daher nicht detektiert werden. In der Regel wird zur Abtrennung eines Rauschhintergrundes eine Schwelle von 3 σ gewählt [1]. Da im vorliegenden Fall die Sondenmoleküle gegenüber dem Target in einem Überschuss von bis zu 10^6 vorlagen und dennoch eine falsch positive Zuordnung des Signals vermieden werden sollte, wurde ein wesentlich konservativerer Schwellenwert gewählt, der typischerweise bei 12 σ für die Detektion und bei 8 σ für die Charakterisierung von Aggregaten lag.

Die Trennung des Signals von Sonden- und Zielmolekülen im Intensitätshistogramm hängt von der zeitlichen Auflösung, d.h. der Binweite, ab. Für eine maximale Trennung vom Sondenhintergrund sollten die gesamten Photonen des Durchtritts eines Zielmoleküls in ein Bin fallen. Dies ist somit die minimale zeitliche Auflösung der Detektion. Ist die Binweite größer als die mittlere Aufenthaltsdauer, so verringert sich das S/N-Verhältnis durch Mittelung über den Sondenhintergrund. Verteilt sich der Moleküldurchtritt auf zu viele Bins, nimmt die relative Fluktuation des Sondensignals zu und verringert so das Signal-Rausch-Verhältnis. Im Falle diffusionskontrollierter Bewegung beträgt die Durchtrittszeit etwa das Vierfache der mittleren Diffusionszeit τ_{Diff}. Im Falle reinen Flusses ist sie durch das Verhältnis von Fokusdurchmesser und Flussgeschwindigkeit bestimmt. Für die Messung mit bewegter Probe wurde daher für eine Bewegungsgeschwindigkeit V = 1 mm/s und für einen Fokalradius ω_0 = 0.5 µm eine Binweite von 0.5 ms gewählt, so dass sich das Signal eines Zielmoleküls auf 1-2 Bins verteilt.

Sensitivitätssteigerung durch Bewegung des Messvolumens

Während die Intensitätsanalyse eine einfache Separierung und Quantifizierung des Signals der Zielmoleküle erlaubt, steigert sie nicht die Zahl der Moleküldurchtritte und damit auch nicht die Sensitivität der Detektion. Sie liefert jedoch, ebenso wie die Kreuzkorrelationsanalyse, einen Parameter zur direkten Unterscheidung von gebundenen und ungebundenen Sondenmolekülen, so dass die Größeninformation, die die Diffusionszeit liefert, nicht länger zur Erkennung der Zielmoleküle erforderlich ist. Diese können auch dann erkannt werden, wenn die Probe während der Messung relativ zum Messfokus bewegt wird.

Durch "Scannen" der Probe wurde die Diffusionsbewegung der Moleküle von einer "Flussbewegung" überlagert. Für Moleküle, deren diffusionsbedingte Eintrittsfrequenz in das Volumenelement klein gegenüber ihrer Aufenthaltsdauer im Messvolumen ist, kann die Detektionsempfindlichkeit durch Vergrößerung des Messvolumens, d.h. durch "Scannen" der Probe, entscheidend erhöht werden.

Im Gegensatz zur stationären Messung, bei der die Messlösung in der Regel als Tropfen auf einem Deckglas ruhte, wurde die Probenlösung für die Messung mit bewegtem Volumenelement in eine gezogene Glaskapillare gefüllt, die ein Volumen von 20 µl umschloss. Die versiegelte Messkapillare wurde während der Messung mäanderförmig mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s bewegt und damit das Probenvolumen durchmessen. Die Durchtrittszeit der Aggregate durch das Messvolumen verringerte sich durch das "Scannen" der Probe von 3 - 50 ms auf ~ 0.5 ms. Die Durchtrittszeit wurde daher allein durch die Flussgeschwindigkeit und durch die Geometrie des Messvolumens bestimmt. Damit wurde auch die Zahl der Messkanäle mit einem Signal hoher Intensität proportional zur Zahl der markierten Partikel, die durch das Messvolumen traten.

Durch die geringe Zahl an Ereignissen in der stationären Messung ließ sich der Gewinn an Sensitivität durch die Probenbewegung nicht direkt am diagnostischen System messen, da in der Regel in der stationären Probe wenige oder keine Aggregate detektiert wurden. Um die Steigerung der Durchtrittsfrequenz durch das "Scannen" der Probe zu bestimmen, dienten fluoreszente Polystyrolperlen, sogenannte Beads, mit einem Durchmesser von 0.1 µm als Modell für die Aggregate. Die mittlere Diffusionszeit der Beads entsprach mit ca. 3 ms der unteren Grenze der Diffusionszeiten, die für die PrP-Aggregate bestimmt worden waren. In der bewegten Messung (Figur 8) wurden etwa 100-fach mehr Ereignisse detektiert als in der stationären Messung.

Die Zahl der detektierten Ereignisse steigt mit der Geschwindigkeit, mit der die Probe bewegt wird. Wenn die diffusionsbedingte Bewegung vernachlässigt wird, ist die Zahl der detektierten Ereignisse proportional zum durchmessenen Volumen. Bei der Detektion von pathogenen PrP^{Sc}-Aggregaten erhöhte eine Steigerung der Scangeschwindigkeit von 1 mm/s auf 5 mm/s die Zahl der Ereignisse und damit die Sensitivität um den Faktor drei. Die Art der Ansteuerung des Positioniertisches begrenzte im Routineeinsatz jedoch die Bewegung auf 1 mm/s.

Evaluation des SIFT-Verfahrens mit PrP und Antikörpersonden

Die Kombination der Intensitätsanalyse mit einer Probenbewegung, d.h. die "Suche nach intensiv fluoreszierenden Targetmolekülen" *(Scanning for Intensely Fluorescent Targets,* SIFT), wurde hinsichtlich ihrer Detektionssensitivität an einem Modellsystem untersucht. Aufgereinigte Aggregate des pathogenen Prionproteins, die aus dem Hirngewebe des syrischen Hamsters gewonnen wurden, sogenannte *prion-rods,* wurden in Spinalliquor verdünnt. Zur Detektion wurde einerseits fluoreszenzmarkiertes rekombinantes HamsterPrP und andererseits ein markierter PrP-spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet. Das Fluoreszenzsignal wurde in einem Intensitätshistogramm ausgewertet (s. Fig. 9 A,C) und die Anzahl der Kanäle mit einer Intensität oberhalb einer Schwelle von 500 Photonen/Kanal addiert (s. Fig. 9 B,D). Abhängig von der Konzentration der *prion-rods* wurde ein Signal hoher Intensität erhalten. Die PrP-Sonde zeigte jedoch bereits ohne Zugabe von Zielmolekülen einen Anteil an Signal hoher Intensität, vor dessen Hintergrund die *prion-rods* nur bis zu einer Verdünnung von etwa 1:500 nachzuweisen waren. Das sondeninherente Signal, das in den stationären Messungen durch deren geringere Sensitivität nicht zu beobachten war, ist durch Aggregate der PrP-Sondenmoleküle bedingt. Diese können durch zwei Prozesse entstehen: einerseits durch die Selbstaggregation des PrP und andererseits durch die Entstehung hochmolekularer Aggregate beim Markieren des PrP mit dem Fluoreszenzfarbstoff. Die Aggregatbildung bei der Markierung ließ sich trotz sorgfältiger Wahl der Reaktionsbedingungen nicht vollständig unterdrücken. Multimere PrP-Aggregate sind in der bewegten Probe erheblich empfindlicher nachzuweisen, als dies in den Messungen zur Selbstaggregation der Fall war. Dagegen war die Antikörperpersonde weitgehend frei von inhärentem Signal, so dass durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers die Detektionsschwelle um zwei Größenordnungen gesenkt werden konnte.

Figur 10 zeigt das SIFT-Signal in Abhängigkeit von der *prion-rod* Konzentration bei verschiedenen Schwellenwerten. Während sich die Zahl der Kanäle hoher Intensität in Abhängigkeit vom Schwellenwert änderte, hatte die Wahl des Schwellenwertes keinen Einfluss auf die Proportionalität des SIFT-Signals zur Konzentration an *prion-rods.*

Zweidimensionale Intensitätsanalyse

Um die Spezifität der Detektion zu erhöhen, wurde das Detektionssystem um eine zweite Sonde erweitert, die gegen ein anderes Epitop des Prionproteins gerichtet ist. Diese wurde mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff markiert, der im roten Spektralbereich bei 633 nm angeregt werden kann. Bei Bindung der Sonden resultieren Zielmoleküle, die eine hohe Zahl beider Farbstoffe tragen. Dadurch können zwei Parameter zur Isolierung des Signals der Zielmoleküle genutzt werden:

1. die Amplitude der Zweifarben-Kreuzkorrelation und

2. die simultane Fluoreszenzintensität.

Wird das Fluoreszenzsignal mit hoher zeitlicher Auflösung betrachtet, so kann der Durchtritt eines doppelt markierten Aggregats durch eine Spitze im Fluoreszenzsignal identifiziert werden, die gleichzeitig in beiden Messkanälen auftritt. Für eine Intensitätsanalyse beider Detektionskanäle wurde das Fluoreszenzsignal beider Kanäle in einem zweidimensionalen Intensitätshistogramm aufgetragen. Analog zur Intensitätsanalyse eines Messkanals wurden die Fluoreszenzphotonen parallel in zwei Kanälen in Bins von 500 µs gezählt und die Intervalle entsprechend der Zahl der detektierten Photonen in einem zweidimensionalen Feld aufsummiert. Im Intensitätshistogramm, das während der Messung *on-line* dargestellt werden kann, ist die Fluoreszenzintensität der beiden Farben auf den Achsen aufgetragen, die Zahl der Bins eines Intensitätspaares ist durch die Farbe des jeweiligen Punktes logarithmisch dargestellt. Figur 11 zeigt das Intensitätshistogramm einer Messung von *prion-rods,* überlagert mit einer schematischen Darstellung der Signalbereiche.

Durch diese Auswertung wird das Signal von Partikeln, die gleichzeitig ein Signal hoher Intensität sowohl im grünen als auch im roten Detektionskanal zeigen, vom Signal der freien Probe separiert. Das aggregatspezifische Signal liegt im vierten Quadranten des Histogramms, während die überwiegende Zahl der Bins die kombinierte Signalverteilung der beiden freien Sonden wiedergibt und somit im ersten Quadranten liegt (s. Fig. 11, grau umrandet). Wiederum

wird das hochintensive Signal im einfachsten Fall über einen Schwellenwert separiert. Um dem Übersprechen der Detektionskanäle Rechnung zu tragen, wurde ein progressiver Schwellenwert gewählt. Wird in einem Bin ein Signal hoher Intensität in einem der Kanäle detektiert, steigt der Schwellenwert zur Abtrennung des spezifischen Signals im anderen Kanal (s. Fig. 11, grüne Linien). Dies ist streng genommen nur zur Abgrenzung des spezifischen Signals von grünem unspezifischen Signal hoher Intensität erforderlich. Das Emissionsspektrum des grünen Farbstoffs überlappt zu einem kleinen Teil mit dem Emissionsspektrum des roten Fluorophors. Etwa 0.5% der Photonen, die ein Molekül, das nur grüne Fluorophore trägt, beim Durchtritt durch den Fokus emittiert, werden daher vom roten Detektor aufgefangen.

Durch die gleichzeitige Markierung mit zwei Typen von Sondenmolekülen konnte die Spezifität der Detektion erhöht werden. Beide Sonden, die gegen unterschiedliche Epitope des Zielmoleküls gerichtet waren, banden unabhängig voneinander an das Aggregat. Gleichzeitig erfolgte zum Teil eine unspezifische Bindung der Sonden an zelluläre Bestandteile in der Probenlösung sowie eine Bindung durch sekundäre Proteine, z.B. Sekundärantikörper, die in der biologischen Probe vorlagen. Diese Prozesse führten zur Bildung intensiv fluoreszierender Partikel. In der Messung, die in Figur 11 dargestellt ist, war dies für die rot markierte Antikörpersonde der Fall. Ob derartige unspezifische Aggregate in einem oder beiden Kanälen auftraten, hing jedoch von der untersuchten Probe sowie von anderen schwer zu kontrollierenden Faktoren wie der Präparation der Antikörper ab. Dieses Signal, das nur in einem der Messkanäle auftritt (s. Fig. 11, rote und grüne Elipse), kann in der Zweifarben-Intensitätsanalyse ebenfalls vom spezifischen Signal unterschieden werden.

Evaluierung von Spezifität und Sensitivität

Das erweiterte Detektionssytem wurde wiederum hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität der Detektion am diagnostischen Modellsystem evaluiert. Dazu diente Liquor von Kontrollpatienten, der mit *prion-rods* versetzt wurde.

Die Spezifität der Erkennung des Zielmoleküls wurde anhand von spezifischen und unspezifischen Sonden sowie spezifischen und unspezifischen Zielmolekü-

len untersucht (s. Fig. 12). Als spezifische Sonden wurden jeweils zwei monoklonale Antikörper verwendet. Ohne die Zugabe von *prion-Tods* wurde fast kein gleichzeitiges Signal hoher Intensität beobachtet (s. Fig. 14). Nach Zugabe von aggregiertem Aβ(1-42) Peptid als unspezifisches Zielmolekül wurden ebenfalls keine doppelt markierten Aggregate beobachtet, wenn auch ein Antikörper (3F4) unspezifisches Signal zeigte (Fig. 12 b). Dagegen trat bei Zugabe von spezifischen Sonden -3F4 und 12F10 zu PrP-Zielmolekülen sowie 6E10 und pAB42 zu Aβ(1-42) Peptid - ein starkes Signal doppelt markierter Zielmoleküle (Fig. 12 a,c) auf. Um zu prüfen, ob zwei unspezifische Sonden gleichzeitig an ein einzelnes Zielmolekül binden, wurden zwei Sonden gegen die Zielmoleküle 1L8 und Aβ(1-40), die nicht mit der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung assoziiert sind, zu Kontrolliquor zugegeben, der *prion-rods* enthielt. Obwohl ein Signalanteil hoher Intensität in beiden Kanälen auftrat, der durch Bindung oder Aggregation der Sonden entstanden sein kann, wurde kein hochintensives Signal beobachtet, das simultan in beiden Kanälen auftrat (Fig. 12 d).

Die Sensitivität des Detektionssystems wurde mit dem Nachweis von Prionprotein durch *Western Blot* nach Verdau mit Proteinase K verglichen. Auf diesem Verfahren beruhen praktisch alle derzeitigen Test auf pathogenes Prionprotein. Aliquots des in Liquor verdünnten *prion-rod* Materials wurden parallel durch Western Blot analysiert und in einem konfokalen fluoreszens-Spektroskopische Aufbau vermessen, wobei das Signal durch SIFT und Kreuzkorrelationsanalyse ausgewertet wurde (s. Fig. 13). Figur 14 zeigt die Intensitätshistogramme bei unterschiedlicher Konzentration. Die Konzentration der *prion-rods* konnte durch ZweikanalIntensitätsanalyse über vier Größenordnungen gemessen werde, wobei die Detektionsschwelle bei einer Verdünnung von $1{:}2 \cdot 10^5$ lag. Die Detektionsschwelle des *Western Blots* lag dagegen bei $1{:}10^4$. Das Signal des *Western Blot* wurde anhand der Bandenintensität geldensitometrisch quantifiziert. Durch Vergleich mit dem parallel aufgetragenen Hirngewebe eines Scrapie-infizierten Hamsters wurde ermittelt, dass die Nachweisgrenze des Blots etwa 1 µg Hirngewebe entsprach. Diese Menge Gewebe enthält etwa 10 pg monomeres PrP^{Sc} [17], was bei der aufgetragenen Menge von 20 µl einer Konzentration von 33 pM entspricht. Dementsprechend war

das Detektionslimit der SIFT-Messung, bei dem in der Messzeit von 600 s noch ein bis zwei Aggregate detektiert wurden, 0.5 pg bzw. 2 pM PrP^{Sc}.

Die physikalische Detektionsschwelle der Messung ist die Detektion eines einzelnen Partikels im durchmessenen Volumen. Bei einem Scanvolumen von ca. $2 \cdot 10^6$ Fokalvolumina des konfokalen Aufbaus entspricht dies einer Konzentration von 1 fM, wenn man Verzerrungen des Volumenelementes vernachlässigt. Die Aggregatkonzentration, die sich aus der SIFT Messung durch Überlegungen zur Detektionsschwelle ergibt, lässt sich ins Verhältnis zur Konzentration des monomeren PrP setzen, die im *Western Blot* bestimmt wurde. Dies führt zu einer mittleren Aggregatgröße von ca. 1000 PrP Molekülen.

Die Sensitivität im Nachweis von pathologischen amyloiden Aggregaten der Alzheimer Demenz, deren Hauptkomponente Aß-Peptide mit einer Länge von 40-43 Aminosäuren sind, wurde in analoger Weise an Aß(1-42) Peptid untersucht, das zuvor unter kontrollierten Bedingungen aggregiert worden war. Als fluoreszente Sonden dienten zwei Antikörper, von denen einer spezifisch die C-terminalen Aminosäuren des Aß42, der andere dagegen ein Epitop in der Konsensussequenz der Aß Peptide erkannte. Die Aß-Aggregate konnten bis zu einer Konzentration von 100 pM (9 pg) an monomerem Aß42 detektiert werden. Dies lässt auf eine Aggregatgröße von etwa 10^5 Einheiten je Aggregat schließen.

Vergleich mit Kreuzkorrelationsanalyse

Parallel zu der Auswertung mittels SIFT wurde das Fluoreszenzsignal der Messungen durch Kreuzkorrelation der Detektionskanäle nach Gleichung 2 ausgewertet. Die Figur 15 zeigt die Kreuzkorrelationskurven einer Verdünnung von *prion rods* in Liquor. Im Bereich von 0 bis 50 pg PrP (160 pM) ist die Kreuzkorrelationsamplitude proportional zur Menge der eingesetzten *prion rods.* Bedingt durch die hohe Zahl der Fluorophore, die an ein Zielmolekül gebunden sind, lag die effektive Detektionsquantenausbeute (cpms), deren Maß die Zahl der eingesammelten Photonen je Molekül und Sekunde ist, mit bis zu 200 kHz um ein Vielfaches über dem Wert von 1-2 kHz, den doppelt markierte Oligomere in den Versuchen zur Selbstaggregation im Kreuzkorrelationssignal er-

reichten. Die hohe Moleküldetektionseffizienz bedingt ein hohes Signal/Rausch Verhältnis und damit eine hohe Kreuzkorrelationsamplitude. Die Kreuzkorrelationsamplitude war bis zu einer PrP Konzentration von 5 pM vom Signal der Kontrollprobe zu differenzieren. Durch die geringe Zahl der Ereignisse streute die Korrelationsamplitude bei niedrigen Konzentrationen stark.

Innerhalb einer Messreihe waren beide Parameter, $G_{ij}(0)$ und SIFT-Signal, zueinander proportional (s. Fig. 15 c). Damit beide Methoden als allgemeines Maß der Konzentration dienen können, ist es zudem erforderlich, dass beide Signale unabhängig von den Messbedingungen, wie Puffer und Detergenzienkonzentration, korrelieren. Figur 16 vergleicht am Modellsystem des aggregierten Aß-Peptids das Verhältnis beider Signale unter einer Vielzahl von Pufferbedingungen. Es blieb für ein Sondenpaar bei konstanter Anregung gleich.

Liquordiagnostische Anwendung

Die Erfindung offenbart insbesondere ein diagnostisches System zum hochempfindlichen Nachweis pathologischer Aggregate zur Diagnose der Creutzfeldt-Jakob und der Alzheimerschen Erkrankung. Als Untersuchungsmedium bietet sich aus drei Gründen die Untersuchung des Spinalliquors an: Erstens umspült der Liquor das Zentralnervensystem des Menschen. Er ist damit nicht wie z.B. das Blut durch die Blut-Hirn Schranke vom Entstehungsort der pathologischen Aggregate separiert. Zweitens handelt es sich bei Liquor um ein `sauberes' Medium. Er enthält kaum Zellen oder Proteine, die im Bereich der Anregungswellenlängen absorbieren oder selbst fluoreszieren und eignet sich damit gut für fluoreszenzspektroskopische Messungen. Drittens kann er durch Rückenmarkspunktion vergleichsweise einfach und risikolos vom Patienten gewonnen werden. Zum Nachweis neurodegenerativer Sekundärmarker wie dem 14-3-3 Protein geschieht dies im Rahmen klinischer Routineuntersuchungen.

Detektion von pathogenem PrP im Liquor von CJD Patienten

Der Detektionsansatz, der am Modellsystem der *prion-rods* entwickelt und evaluiert wurde, diente auch zum Nachweis von pathologischen Aggregaten des Prionproteins im Spinalliquor von Creutzfeldt-Jakob Patienten. Die Liquorproben wurden direkt mit dem Sondenmix versetzt und 600 s im Zweikanal-SIFT-Messaufbau vermessen. In fünf von 24 Liquorproben der Patienten, deren CJD-Diagnose anhand von klinischen oder neuropathologischen Kriterien gesichert war, konnte so ein spezifisches Signal detektiert werden, das der gleichzeitigen Bindung beider Sonden an ein PrP^{Sc}-Aggregat entsprach. Als Kontrollgruppe diente ein Patientenkollektiv mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen, um sicherzustellen, dass der Test spezifisch für CJD war und nicht nur einen Sekundäreffekt neurodegenerativer Erkrankungen erkannte. Aus keiner der Proben der Kontrollpatienten wurde ein Signal erhalten, das für PrP^{Sc} spezifisch war (s. Fig. 17). Dies entspricht formal einer Sensitivität von 21% und einer Spezifität von 100% für den Nachweis der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung. Dies ist bislang der höchste Wert eines erregerspezifischen Tests im Liquor eines Patienten [2].

Liquordiagnose von Morbus Alzheimer

Die Alzheimersche Erkrankung ist durch die erhöhte Entstehung von Fragmenten eines Transmembran-Proteins, dem sogenannten Amyloid-Precursor-Protein (APP), gekennzeichnet, die in einem Folgeprozess aggregieren und amyloide Ablagerungen bilden. Anders als das pathologische PrP^{Sc} sind die amyloiden *Aß*-Peptide als normale Stoffwechselprodukte auch im gesunden Menschen in geringer Menge nachzuweisen. Eine pathologisch erhöhte Menge an aggregierten Peptiden ist daher durch einen Schwellenwert zu definieren.

Mittels der Zweikanal-Intensitätsanalyse wurden unbehandelte Liquorproben von sechs Alzheimer Patienten sowie 16 Proben von Patienten, die an anderen neurodegenerativen Erkrankungen litten, sowie von gesunden Patienten untersucht. Dabei wurde das Antikörper-Sondensystem verwendet, das anhand von künstlichen *Aß*42 Aggregaten etabliert und evaluiert worden war. In 83% (5 / 6 Fällen) der untersuchten SpinalliquorProben von Alzheimer-Patienten lag die

Menge an aggregatspezifischem Signal über dem gesetzten Schwellenwert. Dagegen lag das Signal aller Kontrollpatienten darunter (s. Fig. 18).

Bei den untersuchten Liquorproben handelt es sich sowohl im Falle der Alzheimer- als auch der Creutzfeldt-Jakob-Patienten um solche, die im Rahmen von klinischen Routineuntersuchungen, wie z.B. dem Nachweis des neurodegenerativen Sekundärmarkers 14-3-3, gewonnen wurden. Sie sind hinsichtlich ihrer klinischen Vorgeschichte daher sehr heterogen. Es wurde eine Serie von 5 AD Proben und 4 Kontroll-Liquorproben untersucht, die eigens asserviert wurden. Hier konnte in den AD-positiven Probe eine deutlich größere Menge amyloider Aggregate nachgewiesen werden als in den Proben aus der klinischen Routinediagnostik, was die Bedeutung der Probenvorbereitung unterstreicht.

Differenzierung von Prionstämmen

Für die Detektion pathologischer Aggregate im Rahmen der diagnostischen Systeme wurde in der Zweikanal-Intensitätsanalyse allein ausgewertet, ob ein Aggregat mit einer großen Zahl beider Sondenmoleküle markiert war. Im Gegensatz zur Korrelationsanalyse, die Aussagen über die mittlere Konzentration und den Markierungsgrad der detektierten Moleküle liefert, erfasst die Intensitätsanalyse das Signal jedes detektierten Partikels separat. Daher erlaubte sie, das Verhältnis des Signals in beiden Messkanälen und damit das Verhältnis der gebundenen Sonden für jedes Zielmolekül zu bestimmen. Damit war neben der Detektion von Aggregaten auch ihre Charakterisierung anhand der relativen Affinität mehrerer Sonden möglich.

Die differentielle Bindung einer Anzahl unterschiedlicher monoklonaler Antikörpersonden an pathologisches Prionprotein wurde an aufgereinigtem menschlichem PrP^{Sc} untersucht. Dabei war es möglich verschiedene Typen des pathogenen Prionproteins zu differenzieren. Die Messung erfolgte im gleichen Messaufbau wie die diagnostische Anwendung. Zur Bestimmung des Verhältnisses des Signals der beiden fluoreszenzmarkierten Sonden in einer Messung wurde das Intensitätshistogramm der Zweikanal-Intensitätsanalyse in Sektoren gleichen Signalverhältnisses unterteilt. In jedem Sektor wurde die Zahl der Messkanäle, deren Intensität über einem Schwellenwert lag, bestimmt (Fig.

20). Das aggregatspezifische Signal wurde über eine Schwelle von 8 · σ abgetrennt. Das Signal hoher Intensität konnte mit dieser Schwelle sicher vom Sondensignal separiert werden. Ein Störsignal der unspezifischen Sondenaggregation wurde hingegen nicht vom restlichen Signal hoher Intensität getrennt. Aus diesem Grund enthält der Sektor, in dem das Signal mit einem Anteil der roten Sonde von 0-10% zusammengefasst ist, in allen Messungen einen Anteil unspezifischen Signals. Dieser Anteil wurde in Referenzmessungen bestimmt und vom aggregatspezifischen Signal abgezogen.

Die Trennung der Priontypen wurde mit verschiedenen Sondenpaaren und Detergenzienzusätzen optimiert. Aufgereinigtes pathogenes Prionprotein von Typ 1 und Typ 11 zweier an Codon 129 M/M homozygoter Patienten konnte anhand der relativen Sondenbindung charakterisiert werden. Dabei ließen sich beide Konformation reproduzierbar anhand des Bindungsverhältnisses der Sonden differenzieren (Fig. 21 a). Das aggregatspezifische Signal des Typs 11 (129 M/M) zeigt eine Normalverteilung um ein Sondenverhältnis von 45 ± 15%. Das zusätzliche Signal mit einem grünen Anteil ≥ 90% ist vermutlich auf Aggregation bzw. Vernetzung der Sonde zurückzuführen. Dagegen ist das Markierungsverhältnis im PrP^{Sc} Typ I zugunsten der grün markierten Sonde verschoben (mAB 917Alexa). Nach Abzug des sondeninhärenten Signalanteils liegt das Verteilungsmaximum hier bei einem Anteil der grün markierten Sonde von 85 ± 20%.

Um sicherzustellen, dass die Differenzierung aufgrund der Konformation des Zielmoleküls und nicht aufgrund von Sekundäreffekten, wie z.B. Kontaminationen aus der Aufarbeitung der Proben, erfolgte, wurde eine Mischung von Typ I und Typ II des PrP^{Sc} analysiert. Zwar überlagern sich die Verteilungen beider Typen, doch ist die Gesamtverteilung der Mischung weitgehend deckungsgleich mit der Summe der Intensitätsverteilungen, die aus Einzelmessungen gewonnen wurden (Fig. 21 b). Die unterschiedliche Affinität der Sonden ist also auf die Konformation des Zielmoleküls und nicht auf Kontaminationseffekte zurückzuführen. Ist das Verteilungsmaximum der Priontypen durch Eichmessungen bestimmt worden, lassen sich auch ohne vollständige Trennung der Verteilungen die Anteile von Typ I und Typ II PrP^{Sc} in den Proben bestimmen.

Zur Differenzierung des Signals der PrP^{Sc}-Typen ist es nicht erforderlich, jeden Partikel mit der selben Effizienz zu detektieren. Im Gegensatz zu anderen Methoden zur Charakterisierung einzelner Partikel durch die relative Bindungsaffinität mehrerer Sonden, wie z.B. der FACS-Analyse auf Zellebene, liefert die quantitative Detektion des Fluoreszenzsignals auf Basis einzelner Molekül-durchtritte einen internen Standard zur Bestimmung des Markierungsverhältnisses.

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetat
AD	Alzheimersche Demenz bzw. Erkrankung
Alexa488	Alexa Fluor™ 488 (Handelsname eines Rhodaminderivats)
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AS	Aminosäure
BSA	bovines Serumalbumin
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
CD	Circulardichroismus
CJD	Creutzfeldt-Jakob Demenz bzw. Erkrankung
Cy2 / Cy5	FluoroLink™ Cyanin2 / Cyanin5
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ε	Extinktionskoeffizient
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
Gl.	Gleichung
GPI	Glycolsyl-Phosphadityl-Inositol
h	Stunde(n)
IgG	Immunoglobulin
M	molar
min	Minute(n)

NMR	Kernspinresonanz
NP-40	nichtionisches Alkylphenyl-polyoxyethylen-Detergenz (Handelsname)
nvCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PrP	Prionprotein
PrP^C	zelluläres Prionprotein
PrP^{Sc}	pathologische Scrapie-Isoform des Prionproteins
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen / Minute
rPrP	rekombinantes Prionprotein
RT	Zimmertemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
Tris	Tris-methylaminomethan
IN.	über Nacht
UV	Ultraviolett
w/v	Anteile Gewicht von Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Literatur

[1] Barnes M.D., Whitten W.B., Ramsey J.M. (1995), Detecting Single Molecules in Liquids, Analyt. Chem. 367, 418A-423A.

[2] Brown P, Gibbs C.J., Rodgers-Johnson P, Asher D.M., Sulima M.P., Bacote A., Goldfarb L.G., Gajdusek D.C. (1994), Human spongiform encephalopathy: the National Institute of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease, *Ann. Neurol.* 35, 513-529.

[3] Eigen M., Rigler R. (1994), Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology, *Proc. Natl. Acad. Sci* USA 91, 5740-5747.

[4] Eigen M.(1996), Prionic or the kinetic basis of prion diseases, *Biophys. Chem.* 63, A1-18.

[5] Kask P., Kaupo P., Ullmann D., Gall K. (1999), Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology, *Proc. Natl. Acad.* Sci. USA 13756-13761.

[6] Kettling U., Koltermann A., Schwille P., Eigen M. (1998), Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci* USA 95, 1416-1420.

[7] Kasesak R.J., Rubenstein R., Merz P.A., Tonna-DeMasi M., Fresko R., Carp R.I., Wisniewski H.M., Diringer H. (1987), Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins, J. *Vrol.* 61, 3688-3693.

[8] Krasemann S., Groschup M., Harmeyer S., Hunsmann G., Bodemer W. (1996), Generation of monoclonal antibodies against human prion protein in $PrP^{0/0}$ mice, Mol. *Med.* 2, 725-734.

[9] Magde D., Elson E.L., Webb W.W. (1972), Thermodynamic fluctuations in a reacting systemmeasurement by fluorescence correlation spectroscopy, *Phys. Rev. Lett.* 29, 705-711.

[10] Magde D., Elson E.L., Webb W.W. (1974), Fluorescence correlation spectroscopy II. An experimental realization, *Biopolymers* 13, 29-61.

[11] Magde D., Webb W.W., Elson E.L. (1978), Fluorescence correlation spectroscopy III. Uniform translation and laminar *flow, Biopolymers* 17, 361-376.

[12] Maiti S., Haupts U., Webb W .W. (1997), Fluorescence correlation spectroscopy: Diagnostics for sparse molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci* USA 94, 11753-11757.

[13] Mehlhorn I., Groth D., Stockel J., Moffat B., Reilly D., Yansura D., Willett W.S., Baldwin M., Fletterick R., Cohen F.E., Vandlen R., Henner D., Prusiner S.B. (1996), High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein, *Biochemistry* 35, 5528.

[14] Müller W.E.G., Ushijima H., Schröder H.C., Forrest, J.M., Schatton WF., Rytik P.G., Heffner-Lauc M. (1993), Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists an prion protein (PrP^{Sc})-induced toxicity in rat cortical cells cultures, Eur. J. *Pharmacol.* 246, 261-267.

[15] Oehlenschläger F., Schwille P., Eigen M. (1996), Detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification combined with fluorescence correlation spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12811-12816.

[16] Pitschke M., Prior R., Haupt M., Riesner D. (1998), Detection of single amyloid ßprotein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy, *Nature Medicine* 4, 832-834.

[17] Prusiner S.B., McKinley M.P., Bowman K.A., Bolton D.C., Bendheim P.E., Groth D.F., Glenner G.G. (1983), Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringet rods, *Cell* 35, 349-358.

[18] Qian H., Elson E.L. (1990), Distribution of molecular aggregation by analysis of fluctuation moments Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5479-5483.

[19] Qian H. (1990), On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. Chem.* 38, 49-57.

[20] Riesner D., Kellings K., Wiese U., Wulfert M., Mirenda C., Prusiner S.B. (1993), Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene, *Dev. Biol. Stand.* 80, 173-181.

[21] Rigler R., Mets Ü., Widengren J., Kask P (1993), Fluorescence correlation spectroscopy with high countrate and low background: analysis of translational diffusion, *Eur. Biophys. J* 22, 169-175.

[22] Safar J., Wille H., Itri V, Groth D., Serban H., Torchia M., Cohen RE., Prusiner S.B. (1998), Eight prion strains have PrP3" molecules with different conformations, *Nature Medicine* 4, 1157-1165.

[23] Schwille P. (1997), Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolekülebene, *Dissertation,* Braunschweig

[24] Schwille P, Meyer-Almes F.-J., Rigler R. (1997), Dual-color fluorescence crosscorrelation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution, *Biophys. J.* 72, 1878-1886.

[25] Schwille P., Bieschke J., Oehlenschläger F. (1997), Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: The analytical and diagnostic potential of diffusion studies, *Biophys. Chem.* 66, 211-228.

[26] Schwille P., Haupts U., Maiti S., Webb W .W. (1999), Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation, *Biophys. J.* 77, 2251-2265.

[27] Thompson N.L. (1991), Fluorescence correlation spectroscopy, in: Topics *in fluorescence spectroscopy,* ed. Lakowicz J.R., Vol. 1, Plenum Press, New York, S. 337.

[28] World Health Organisation, Human spongiform enzephalopathies, *Weekly epidemiological record 1998* 73;47 361-265.

[29] Winkler T., Kettling U., Koltermann A., Eigen M. (1999), Confocal fluorescent coincidence analysis: An approach to high throughput screening, *Proc. Natl. Acad Sci USA* 96, 1375-1378.

[30] Zerr I., Bodemer M., Racker S., Grosche S., Poser S., Kretzschmar H.A., Weber T. (1995), Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease., *Lancet* 345, 1609-1610.

[31] Zerr I., Bodemer M., Gefeller O., Otto M., Poser S., Wiltfang J.,Windl O. Kretzschmar H.A., Weber T. (1998), Detection of 14-3-3 Protein m the

cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease, *Ann. Neurol.* 43, 32-40.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung und individuellen Charakterisierung von Partikeln mittels mindestens zweier unterschiedlicher detektierbarer Sonden in einer Probe, wobei

 - die Partikel, insbesondere Moleküle oder Molekülaggregate, mindestens eine Bindungsstelle, vorzugsweise eine Vielzahl von Bindungsstellen für mindestens eine der mindestens zwei unterschiedlichen detektierbaren Sonden aufweisen,
 - die mindestens zwei unterschiedlichen detektierbaren Sonden in der Probe anwesend sind,
 - ein Maß für die Anzahl der gebundenen Sonden und
 - das Verhältnis der gebundenen Sonden zueinander durch Bestimmung von Partikeln ermittelt wird,
 - und wobei die Bestimmung auf Basis von einzelnen Partikeln erfolgt.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis der gebundenen Sonden zueinander durch Bestimmung von Partikeln in einem Messvolumen, das ein Teilvolumen der zu untersuchenden Probe darstellt, ermittelt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung auf Basis von einzelnen Partikeln erfolgt, die sich zu verschiedenen Zeiten im Messvolumen befinden.

4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion verschiedener gebundener Sonden gleichzeitig an einem Partikel erfolgt.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Messvolumen $\leq 10^{-12}$, insbesondere $\leq 10^{-14}$ l beträgt.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Messung unter Verwendung eines konfokal mikroskopischen Auf-

baus, eines Nahfeldaufbaus oder eines Aufbaus zur Mehrphotonenanregung erfolgt.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung und Charakterisierung von Partikeln in einem homogenen Assayverfahren ohne Waschschritte erfolgt.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine Quantifizierung des partikelbedingten Signalanteils durch Analyse der Intensitätsverteilung eines gemessenen Detektionssignals, insbesondere eines Fluoreszenzsignals, in sukzessiven Zeitfenstern mit Detektionszeiten konstanter oder variabler Längen im Bereich von Mikro- bis Millisekunden erfolgt.

9. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass eine intensitätsbedingte Abtrennung des partikelbedingten Signalanteils über einen Algorithmus zur Peakdetektion und -analyse erfolgt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass ein Scannen der Probe durch Erzeugen einer im wesentlichen konstanten Relativbewegung zwischen Probe und Messvolumen erfolgt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Relativbewegung durch eine Optik, die eine Bewegung des Messvolumens ermöglicht, durch eine Bewegung eines die Probe aufweisenden Probenträgers oder durch eine Flusskapillare realisiert wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass Antikörper als Sondenmoleküle verwendet werden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine simultane Analyse zweier oder mehrerer getrennt im selben Messvolumen messbarer, in verschiedenen Wellenlängenbereichen oder Polarisationsebenen emittierender Sonden, insbesondere fluoreszierender Sonden, erfolgt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass Daten aus Mehrfachfarbmessungen, insbesondere Zweifarbmessungen oder Mehrfachpolarisationsmessungen/polarisationsmessungen ermittelt werden und zur Auswertung gegebenenfalls in einem mehrdimensionalen, insbesondere zweidimensionalen Array angeordnet als Intensitätshistogramm dargestellt werden.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass pathologische Proteinaggregate als Partikel, insbesondere Prionproteine nach Subspezies, durch deren Markierung mit Sondenmolekülen detektiert werden.

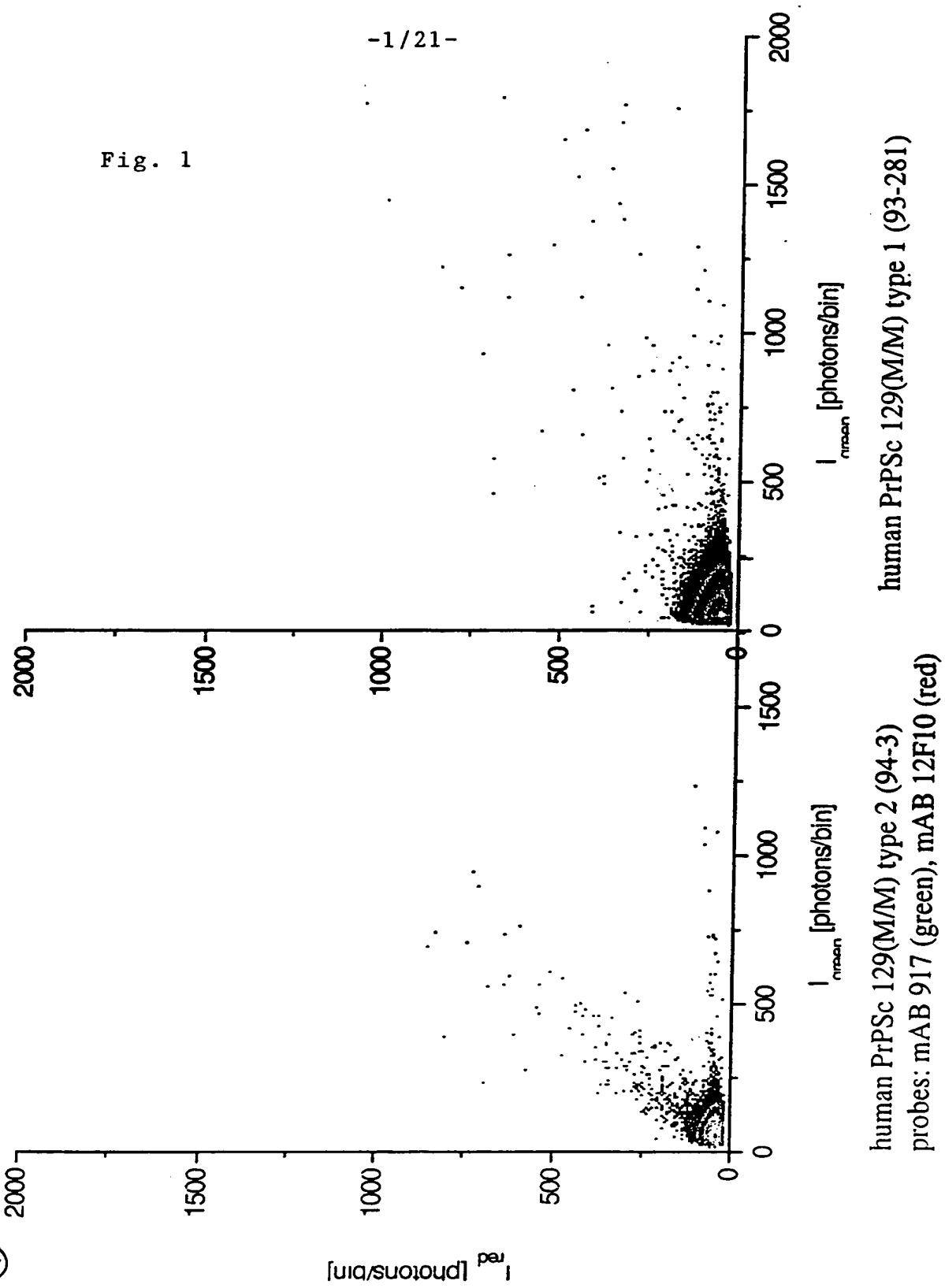
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung mindestens zweiter unterschiedlicher Sondenmoleküle an die Proteinaggregate bildenden Partikel detektiert wird und aus dem Verhältnis der gebundenen Mengen an verschiedenen Sondenmolekülen zueinander die Subspezies bestimmt wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Erregerstammtypisierung oder Untersuchung der relativen Bindung von Proteinen verschiedener Spezies an pathologische Proteinaggregate einer bestimmten Spezies zwecks Abschätzung einer Speziesbarriere für eine Krankheitsübertragung.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17 zur Untersuchung degenerativer Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativer Krankheiten, mit Bildung pathologischer Aggregate, insbesondere Aggregate, die als Komponente Prionprotein, APP, Tau, Synuclein oder Proteine mit einer Polyglutaminsequenz wie Huntingtin, oder Fragmente oder Derivate dieser Proteine enthalten.

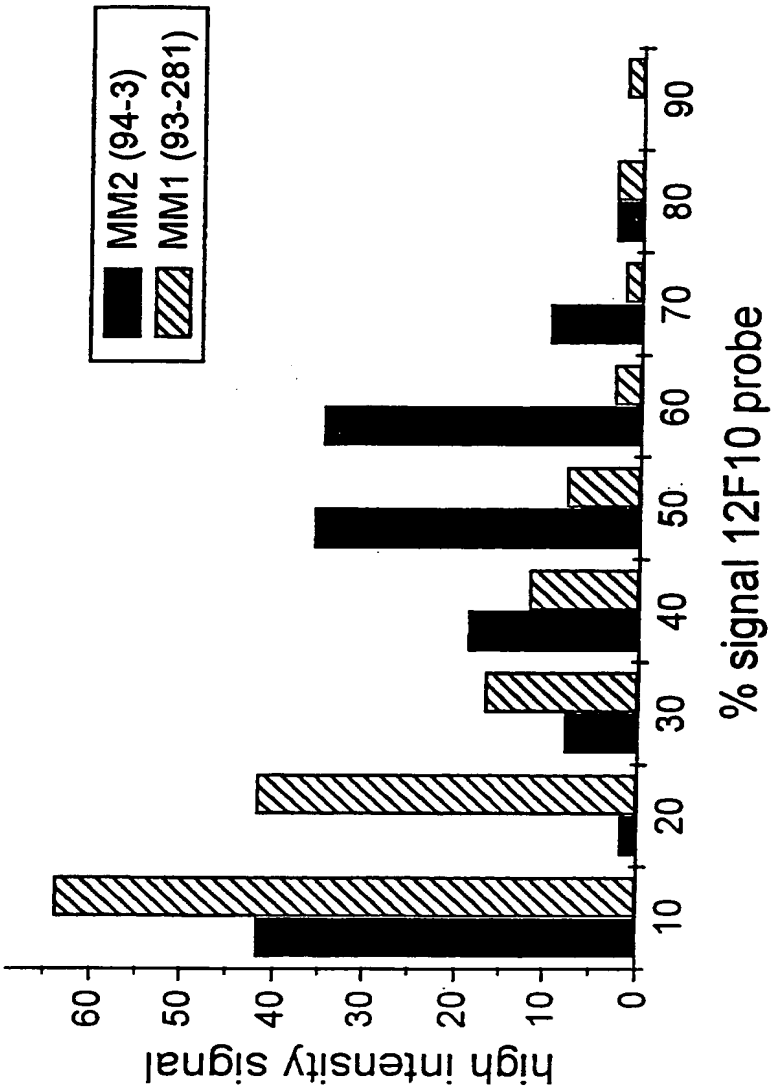
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18 zur Untersuchung subzellulärer Partikel, insbesondere zur phänotypischen Analyse viraler Partikel oder zur Analyse von Nukleinsäuren mittels Antisensesonden.

Fig. 1


human PrPSc 129(M/M) type 1 (93-281)
human PrPSc 129(M/M) type 2 (94-3)
probes: mAB 917 (green), mAB 12F10 (red)
I_green [photons/bin]
I_red [photons/bin]
0
500
1000
1500
2000
42

THIS PAGE BLANK (USP

Fig. 2


MM2 (94-3)
MM1 (93-281)
high intensity signal
0
10
20
30
40
50
60
% signal 12F10 probe
10
20
30
40
50
60
70
80
90

THIS PAGE BLANK (USPTO)

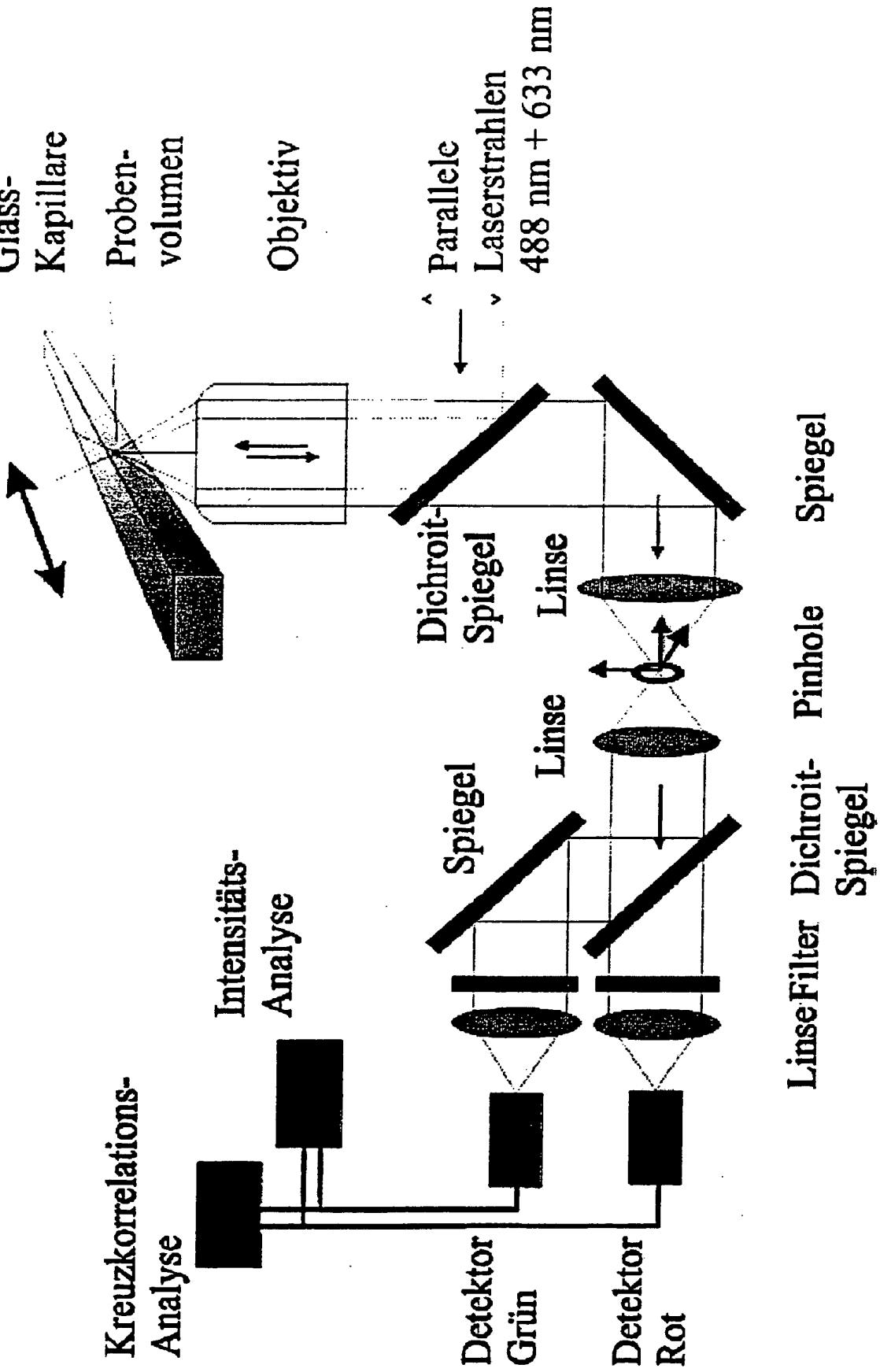
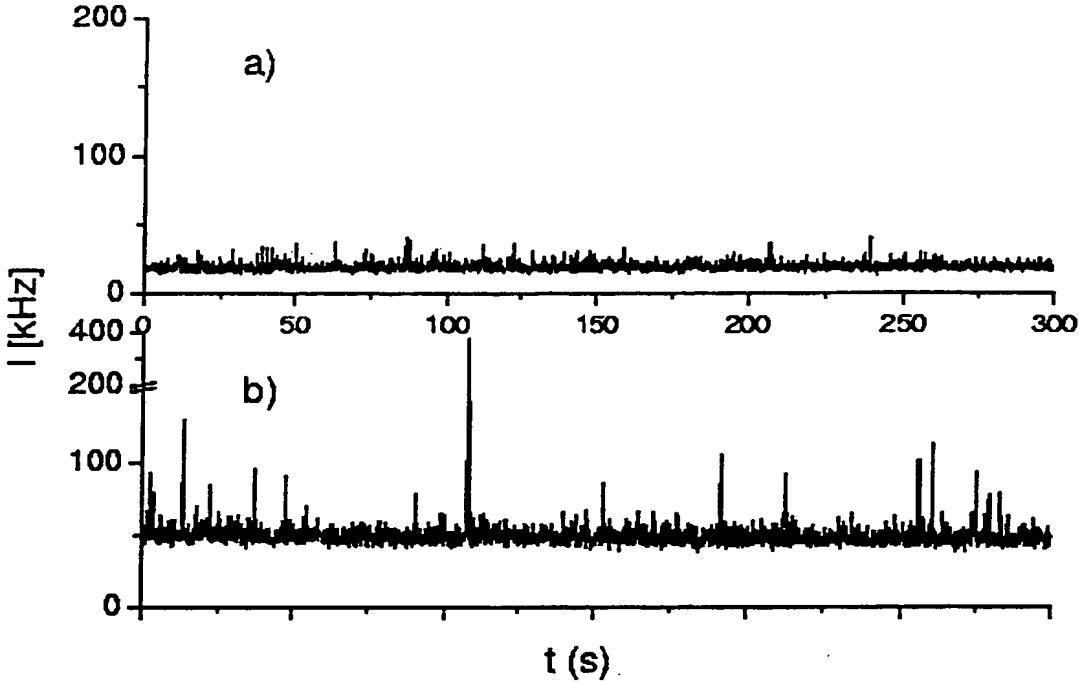

Versiegelte Glass-Kapillare
Proben-volumen
Objektiv
Parallele Laserstrahlen 488 nm + 633 nm
Dichroit-Spiegel
Linse
Spiegel
Pinhole
Linse
Spiegel
Intensitäts-Analyse
Linse
Filter
Dichroit-Spiegel
Kreuzkorrelations-Analyse
Detektor Grün
Detektor Rot

FIG.3

THIS PAGE BLANK (USPTO)


200
a)
100
0
I [kHz]
0
50
100
150
200
250
300
400
200
b)
100
0
t (s)

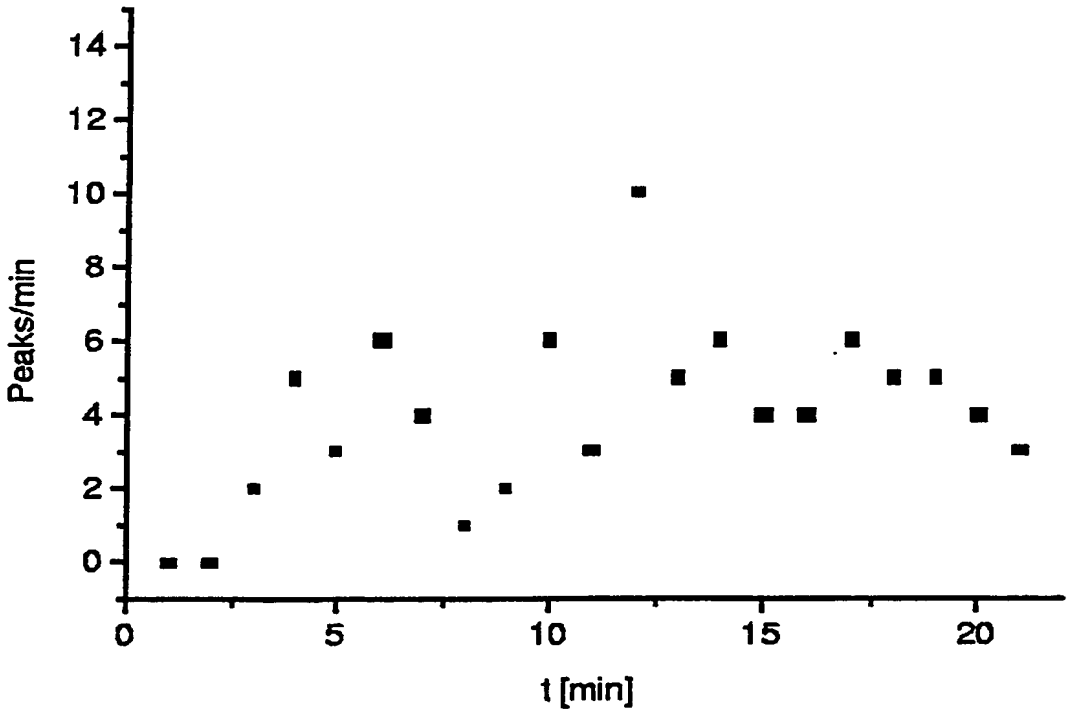

14
12
10
8
6
4
2
0
Peaks/min
0
5
10
15
20
t [min]

FIG.4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

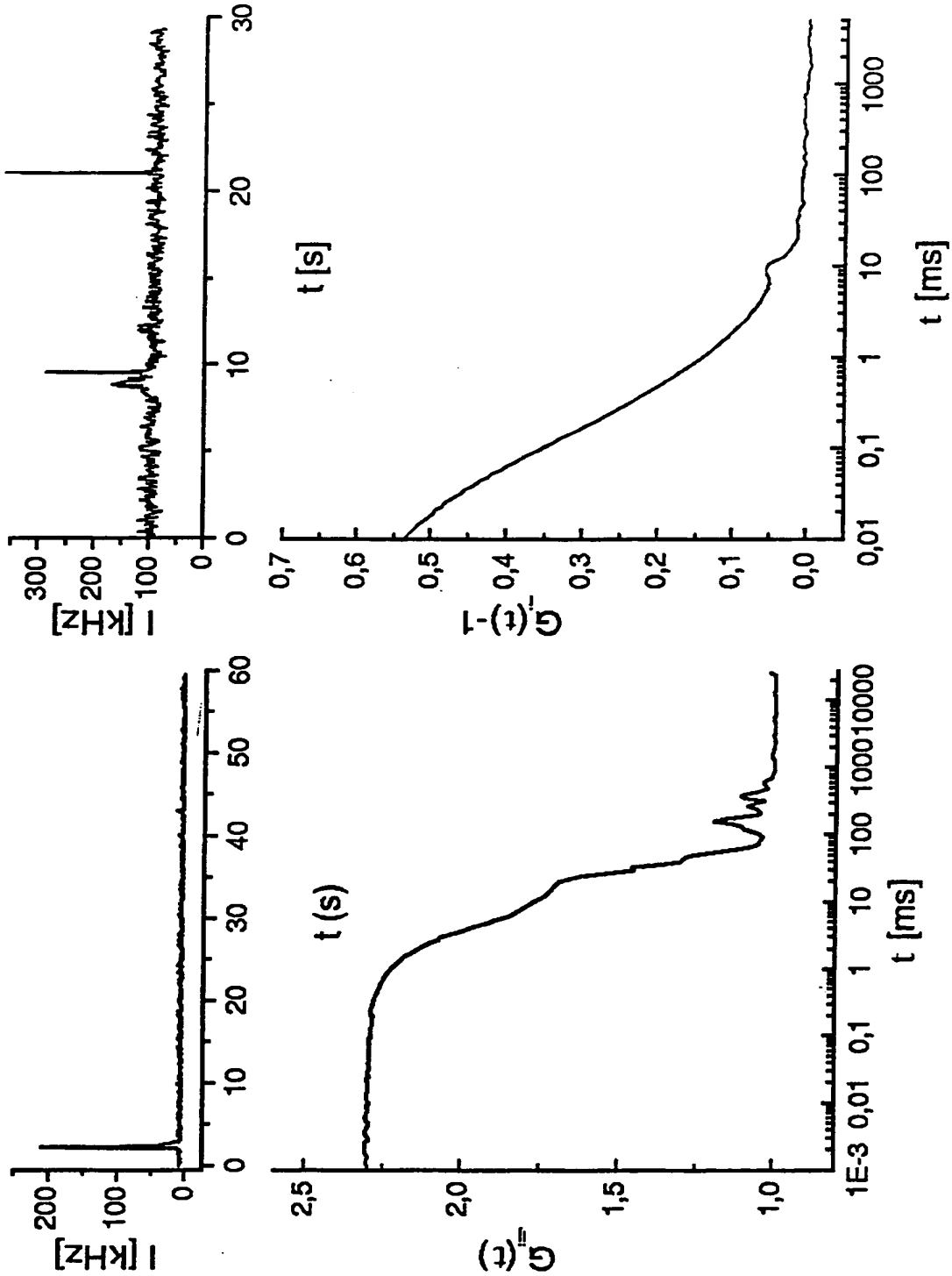

I [kHz]
0
100
200
300
0
10
20
30
t [s]
$G_I(t)-1$
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,01
0,1
1
10
100
1000
t [ms]
I [kHz]
0
100
200
0
10
20
30
40
50
60
t (s)
$G_{II}(t)$
1,0
1,5
2,0
2,5
1E-3
0,01
0,1
1
10
100
10000
t [ms]

FIG.5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

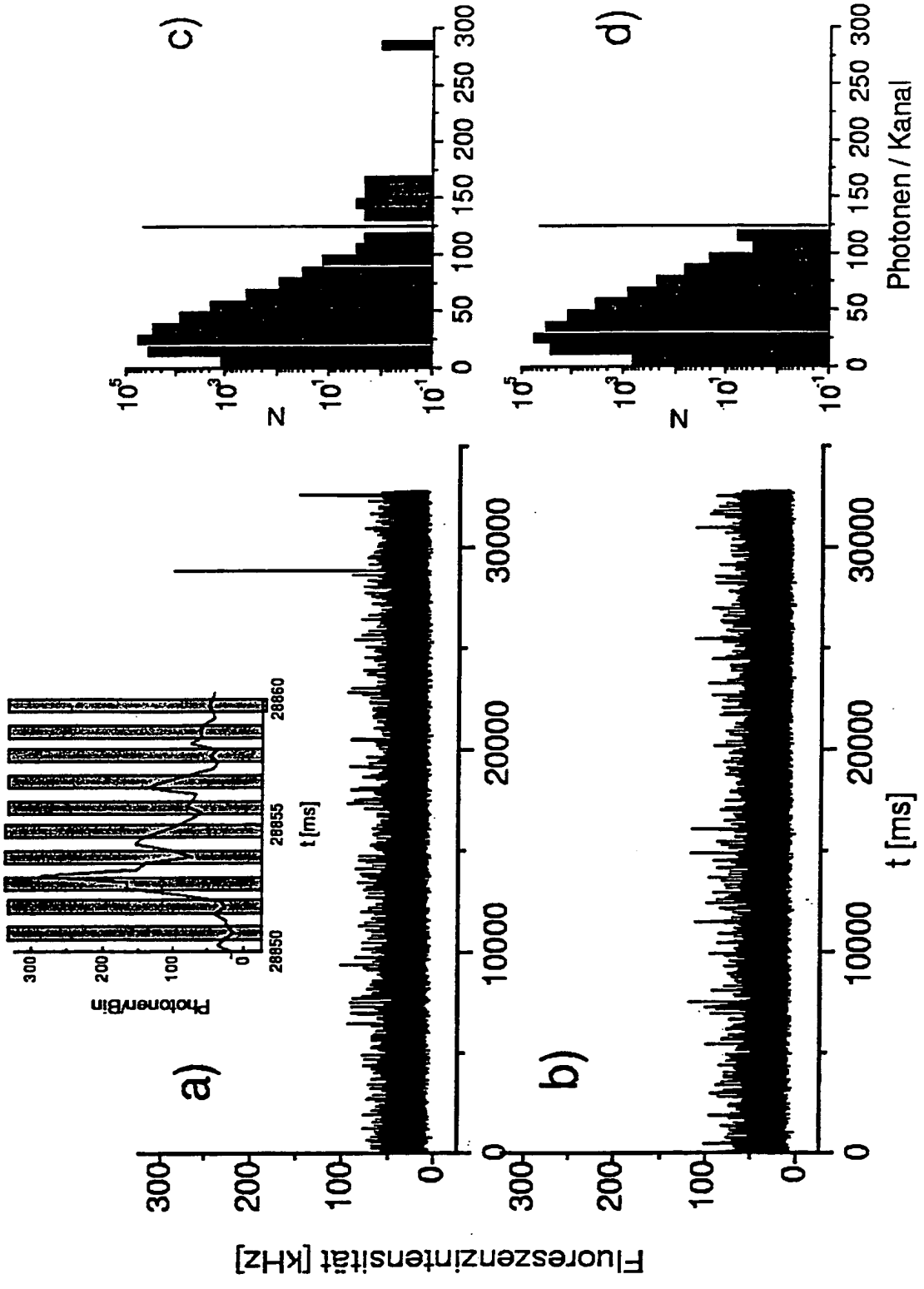

a)
b)
c)
d)
Fluoreszenzintensität [kHz]
t [ms]
Photonen / Kanal
N
Photonen/Bin
t [ms]

FIG.6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

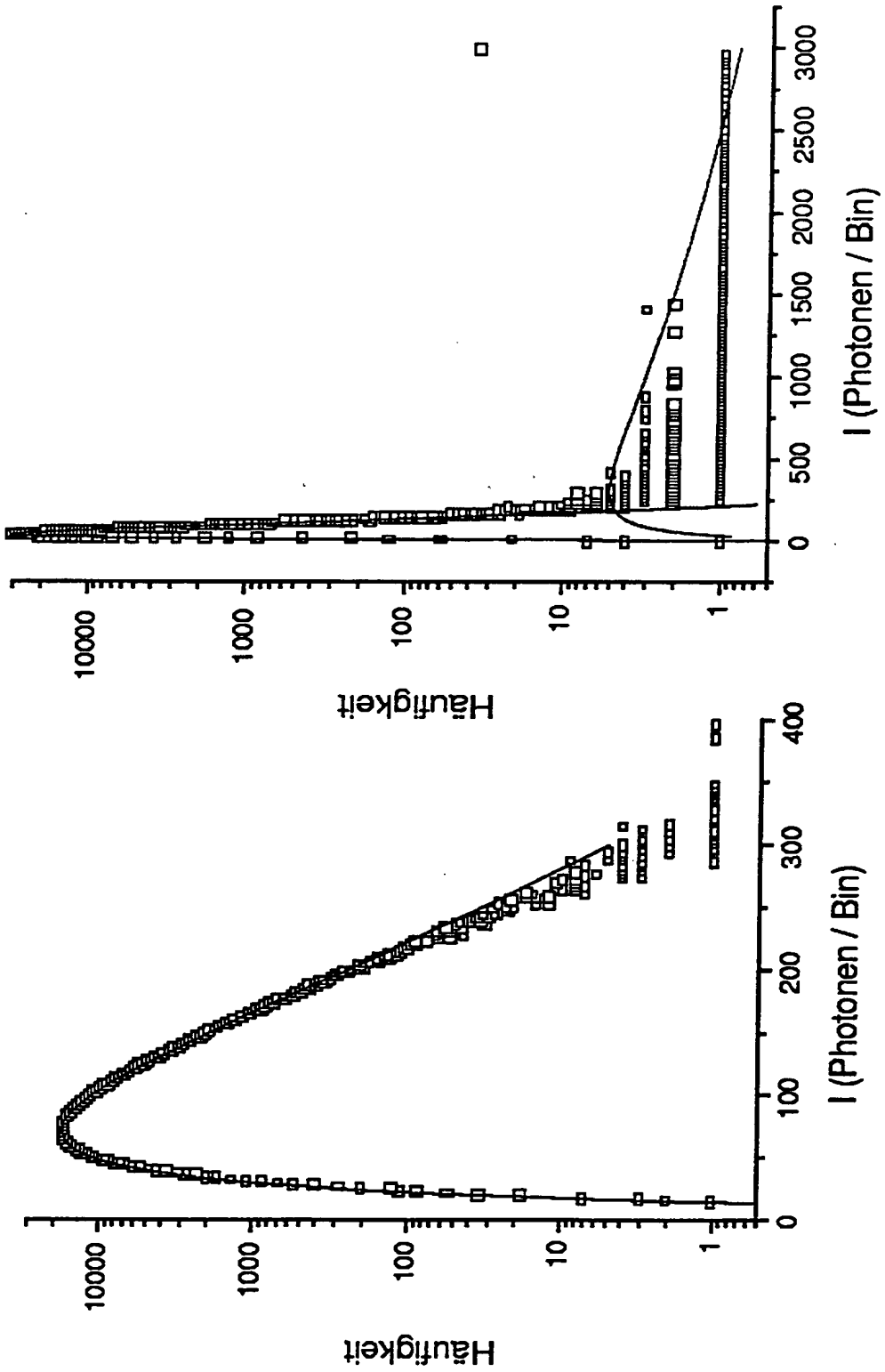

Häufigkeit
10000
1000
100
10
1
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
I (Photonen / Bin)
Häufigkeit
10000
1000
100
10
1
0
100
200
300
400
I (Photonen / Bin)

FIG.7

THIS PAGE BLANK (USPTO

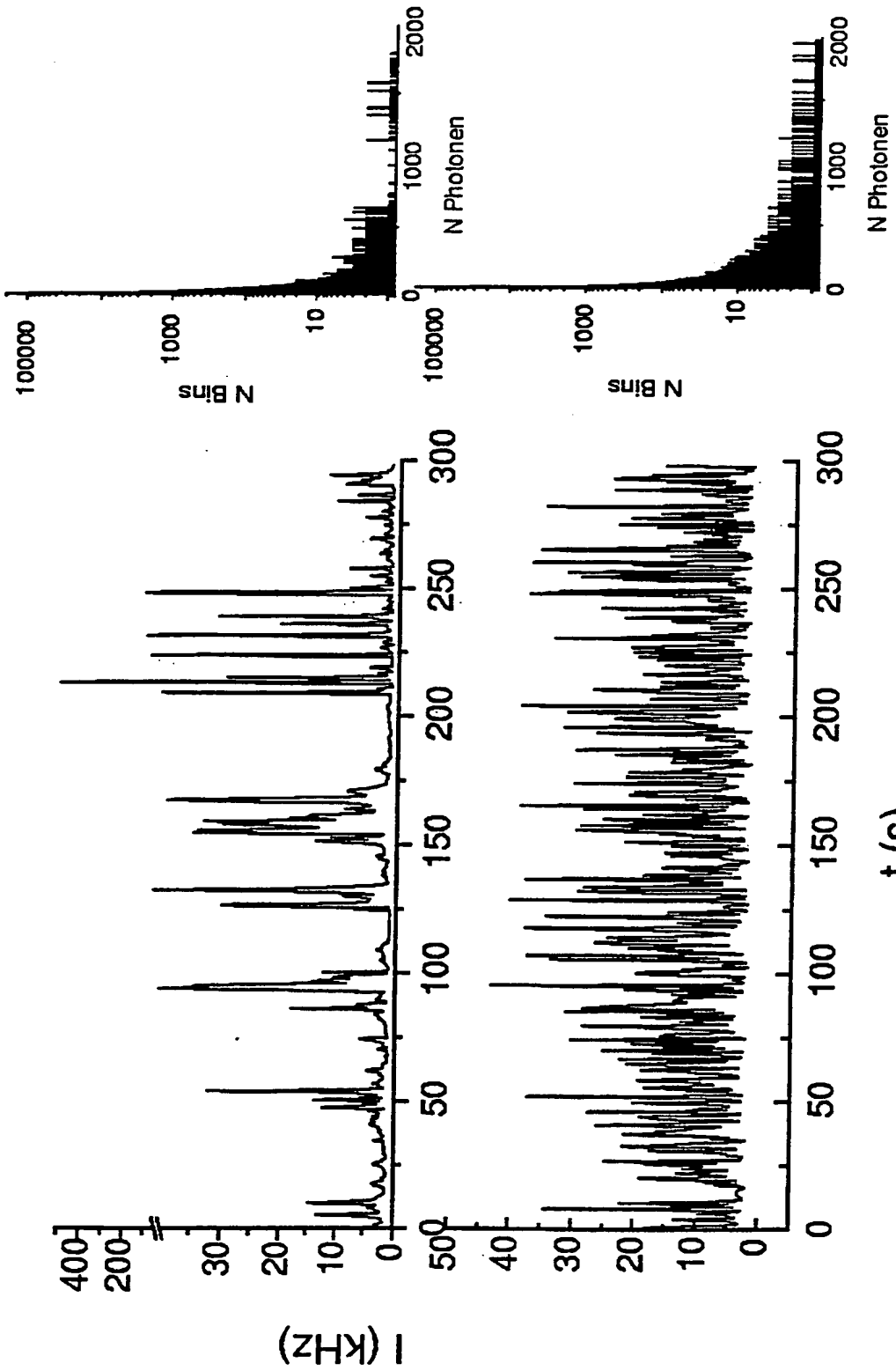


FIG.8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

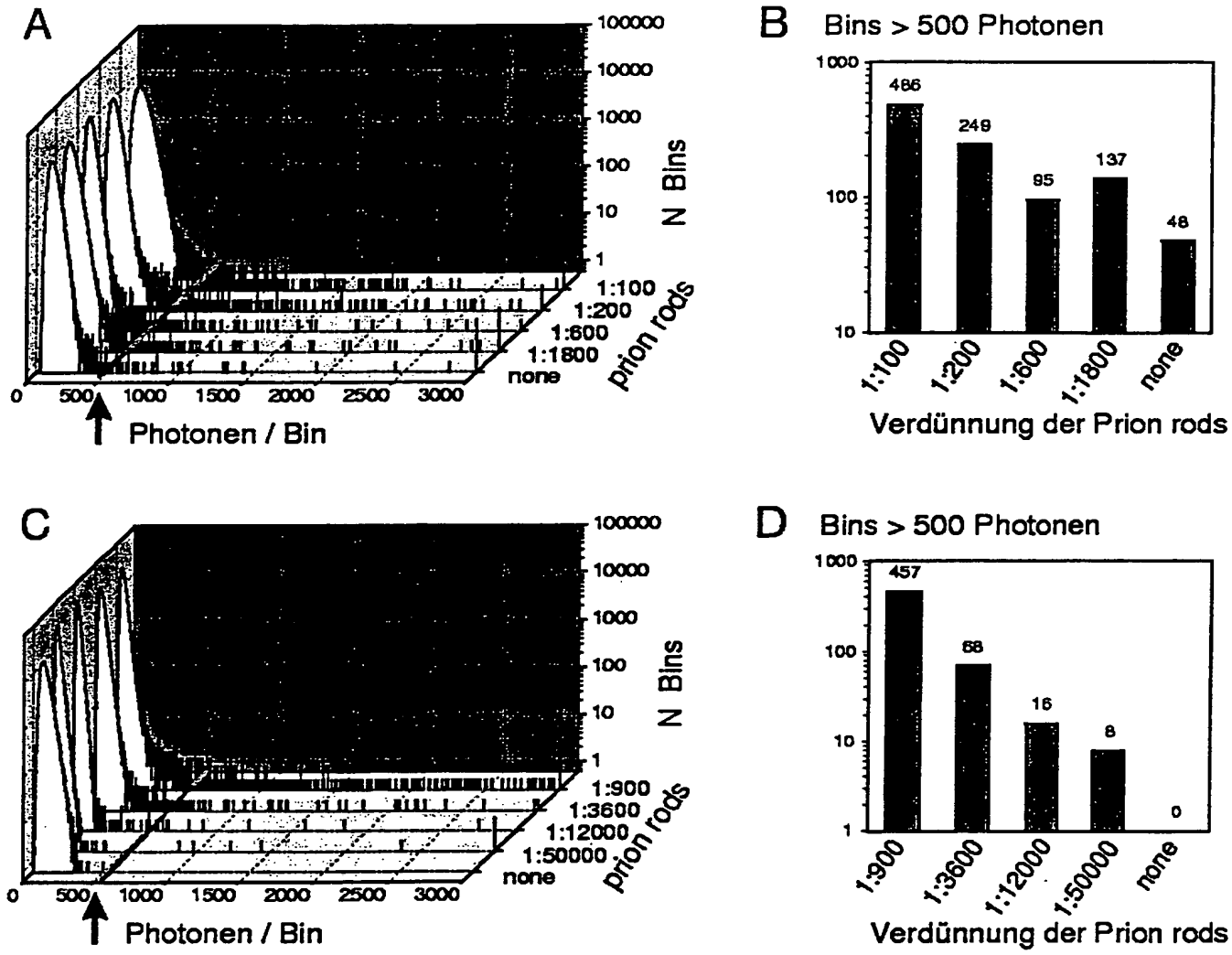

A
100000
10000
1000
100
10
1
N Bins
1:100
1:200
1:600
1:1800
none
prion rods
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
Photonen / Bin
B
Bins > 500 Photonen
1000
100
10
486
249
95
137
48
1:100
1:200
1:600
1:1800
none
Verdünnung der Prion rods
C
100000
10000
1000
100
10
1
N Bins
1:900
1:3600
1:12000
1:50000
none
prion rods
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
Photonen / Bin
D
Bins > 500 Photonen
1000
100
10
1
457
68
16
8
0
1:900
1:3600
1:12000
1:50000
none
Verdünnung der Prion rods

FIG.9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

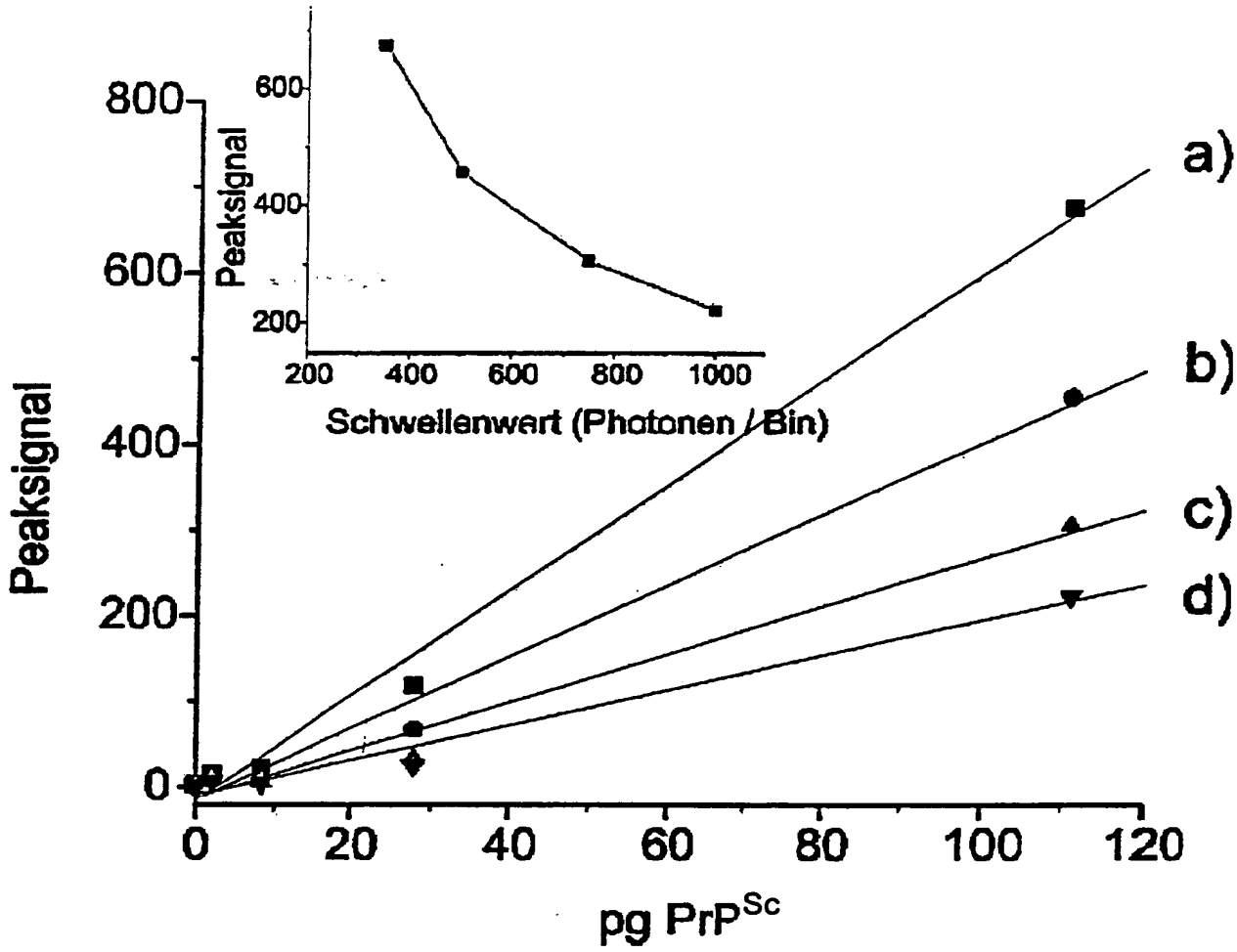

Peaksignal
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
120
pg PrP^Sc
a)
b)
c)
d)
Peaksignal
600
400
200
200
400
600
800
1000
Schwellenwert (Photonen / Bin)

FIG.10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

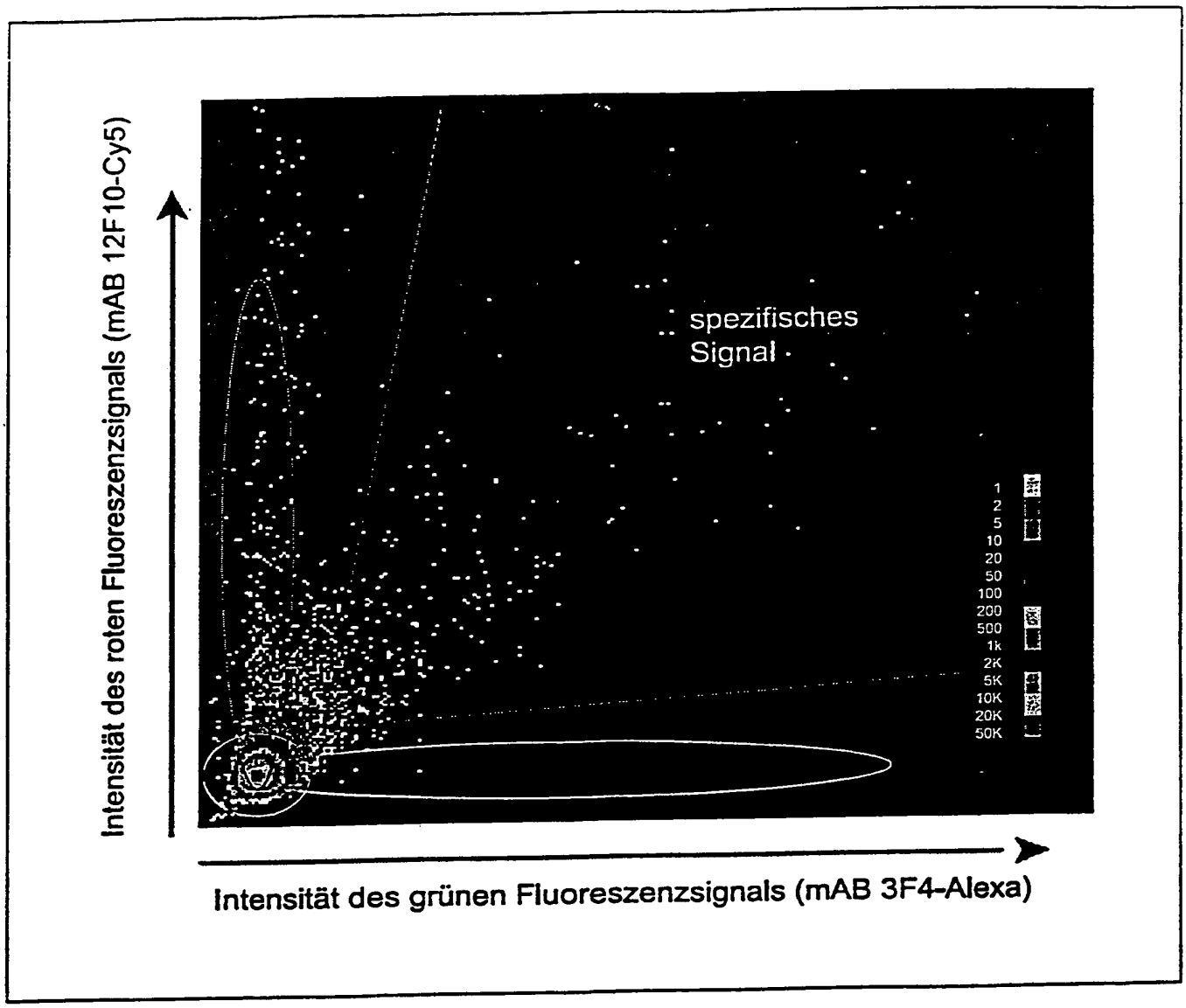
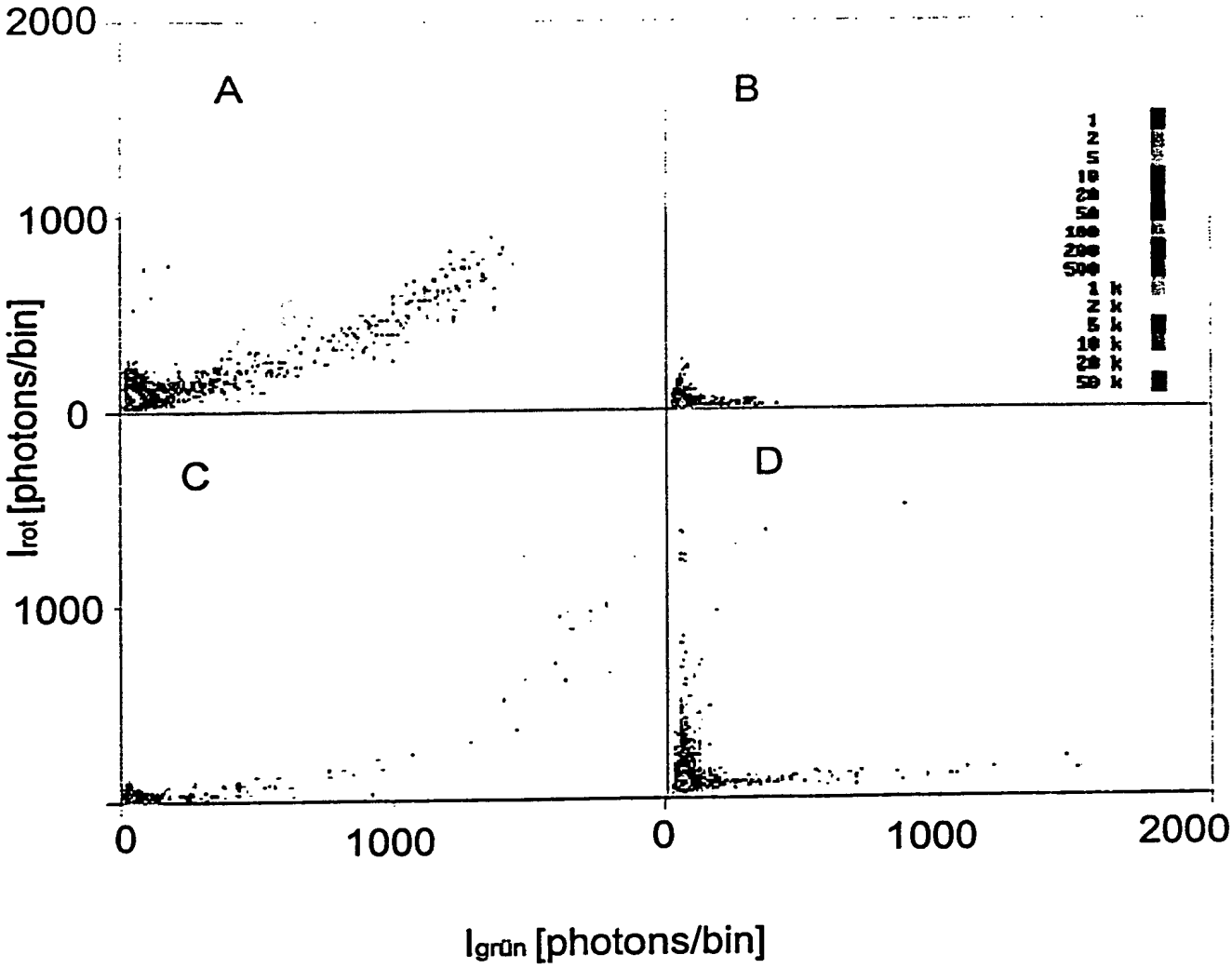
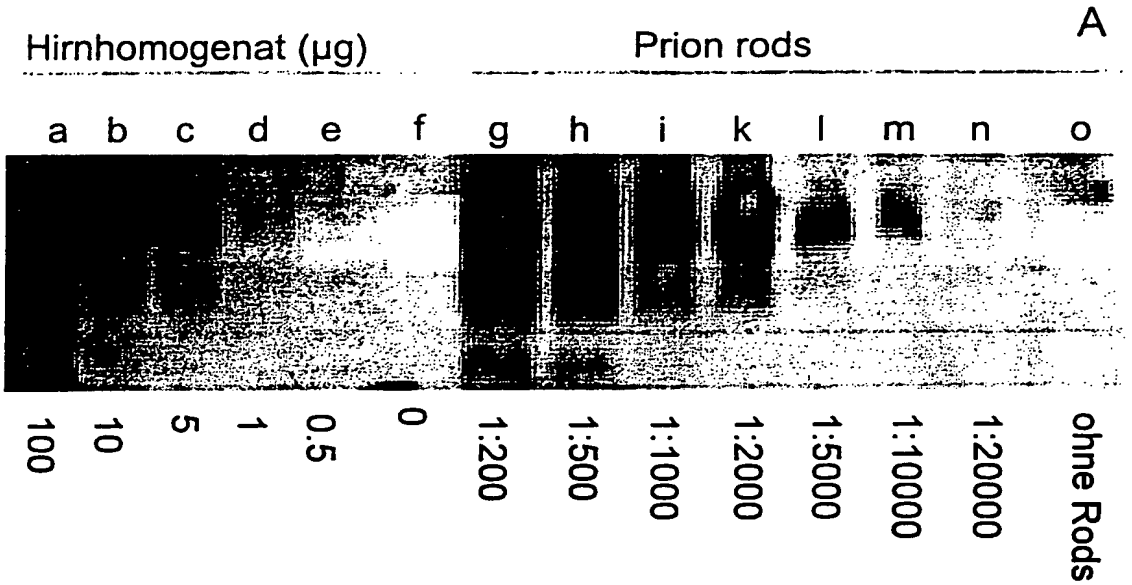

Intensität des roten Fluoreszenzsignals (mAB 12F10-Cy5)
spezifisches Signal
1
2
5
10
20
50
100
200
500
1k
2K
5K
10K
20K
50K
Intensität des grünen Fluoreszenzsignals (mAB 3F4-Alexa)

FIG.11

THIS PAGE BLANK (USPTO)


2000
A
B
1000
0
C
D
1000
0
1000
0
1000
2000
I_{rot} [photons/bin]
$I_{grün}$ [photons/bin]

THIS PAGE BLANK (USPTO)


A
Hirnhomogenat (µg)
Prion rods
a b c d e f g h i k l m n o
100
10
5
1
0.5
0
1:200
1:500
1:1000
1:2000
1:5000
1:10000
1:20000
ohne Rods

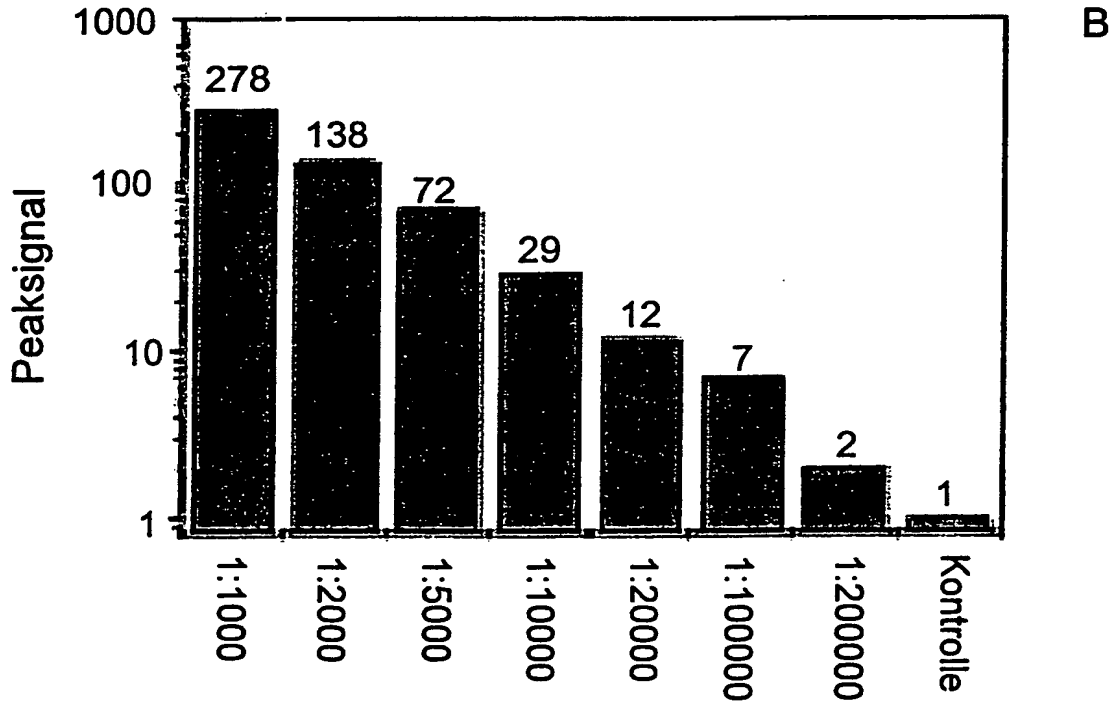

B
Peaksignal
1000
100
10
1
278
138
72
29
12
7
2
1
1:1000
1:2000
1:5000
1:10000
1:20000
1:100000
1:200000
Kontrolle

FIG.13

THIS PAGE BLANK (USPTO

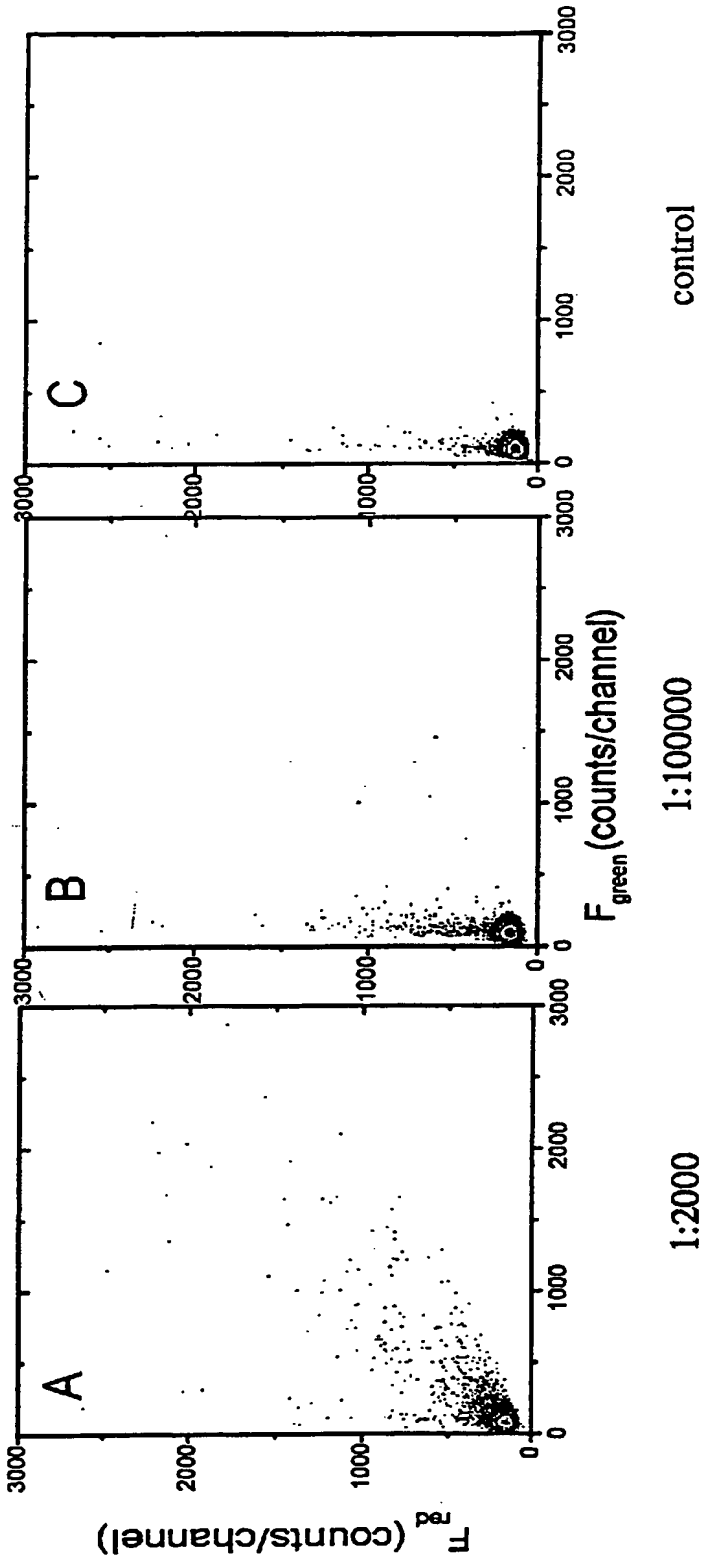

A
B
C
control
1:100000
1:2000
F_{red} (counts/channel)
F_{green} (counts/channel)
0
1000
2000
3000

FIG.14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

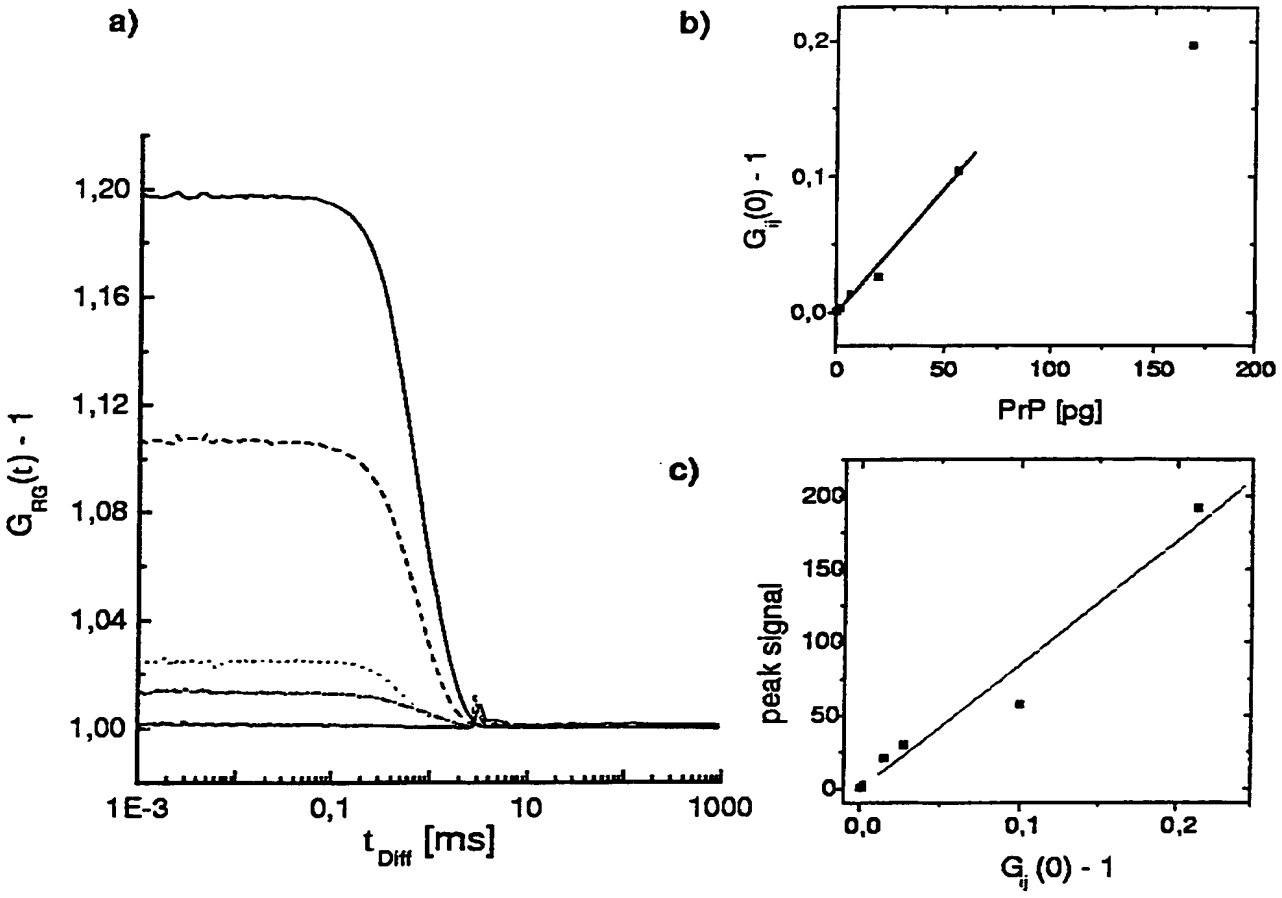
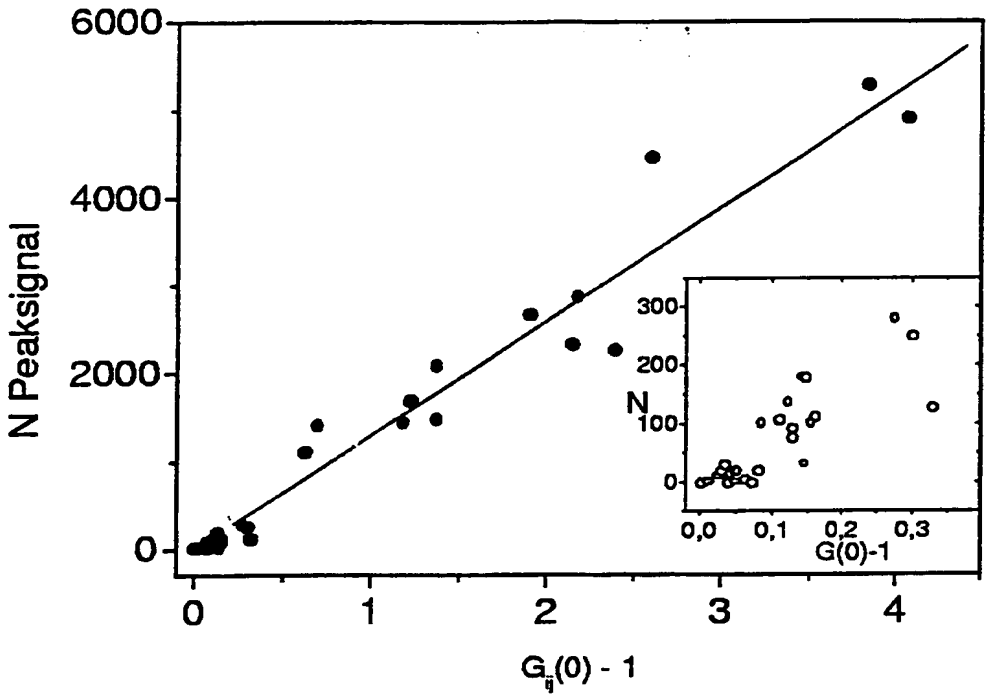

a)
b)
c)
1,20
1,16
1,12
1,08
1,04
1,00
$G_{RG}(t) - 1$
1E-3
0,1
10
1000
t_{Diff} [ms]
0,2
0,1
0,0
$G_{ij}(0) - 1$
0
50
100
150
200
PrP [pg]
200
150
100
50
0
peak signal
0,0
0,1
0,2
$G_{ij}(0) - 1$

FIG.15

THIS PAGE BLANK (USPTO)


6000
4000
2000
0
N Peaksignal
0
1
2
3
4
$G_{ij}(0) - 1$
300
200
N
100
0
0,0
0,1
0,2
0,3
G(0)-1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

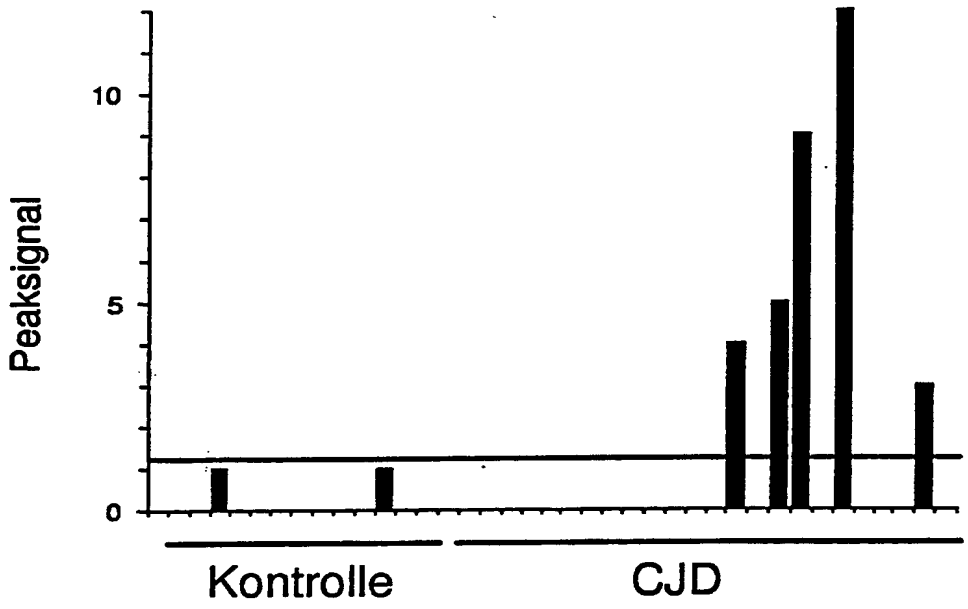


FIG.17

THIS PAGE BLANK (USPTO)

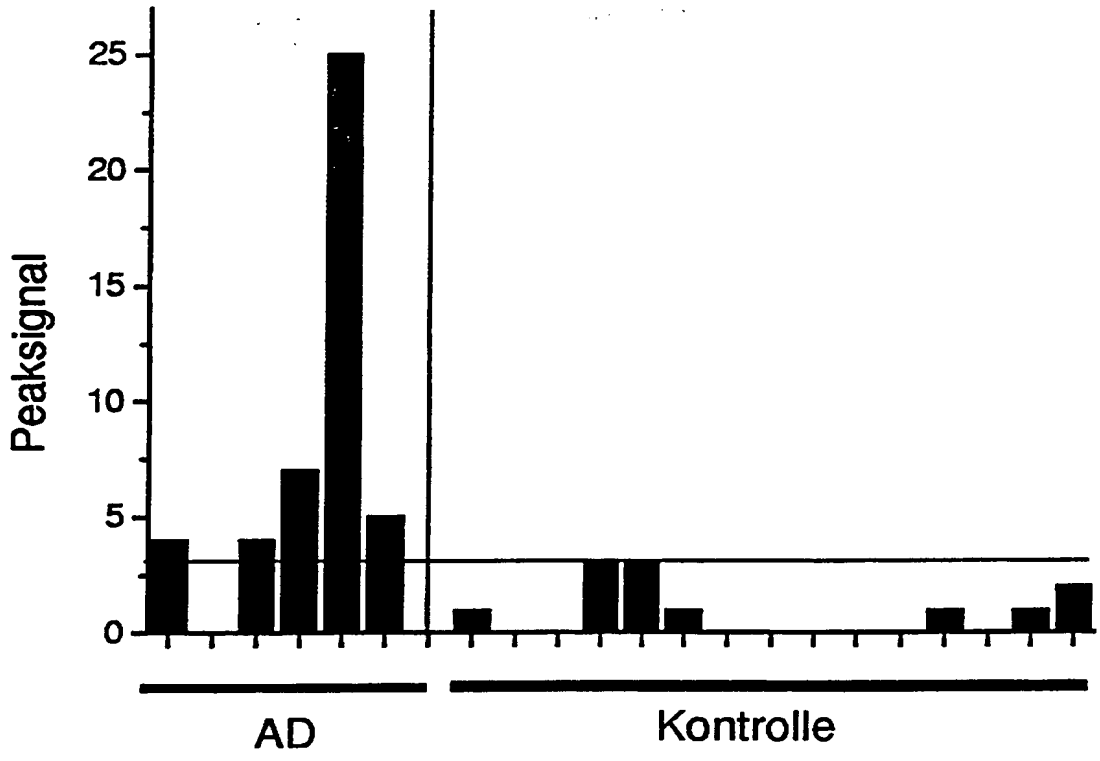


FIG.18

THIS PAGE BLANK (USPTO)

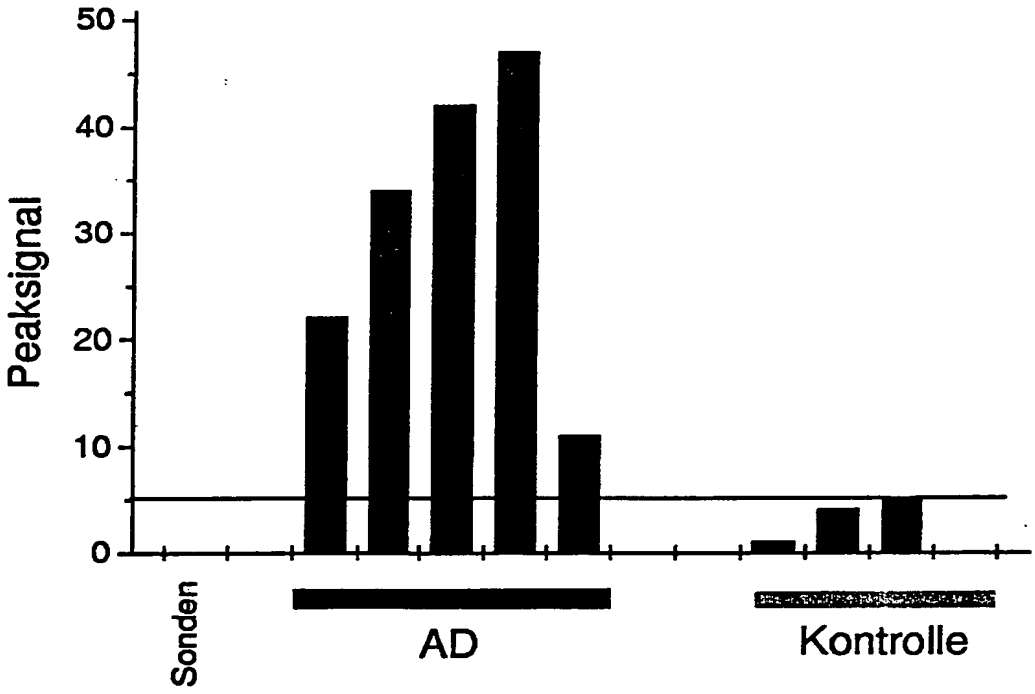


FIG.19

THIS PAGE BLANK (USPTO)

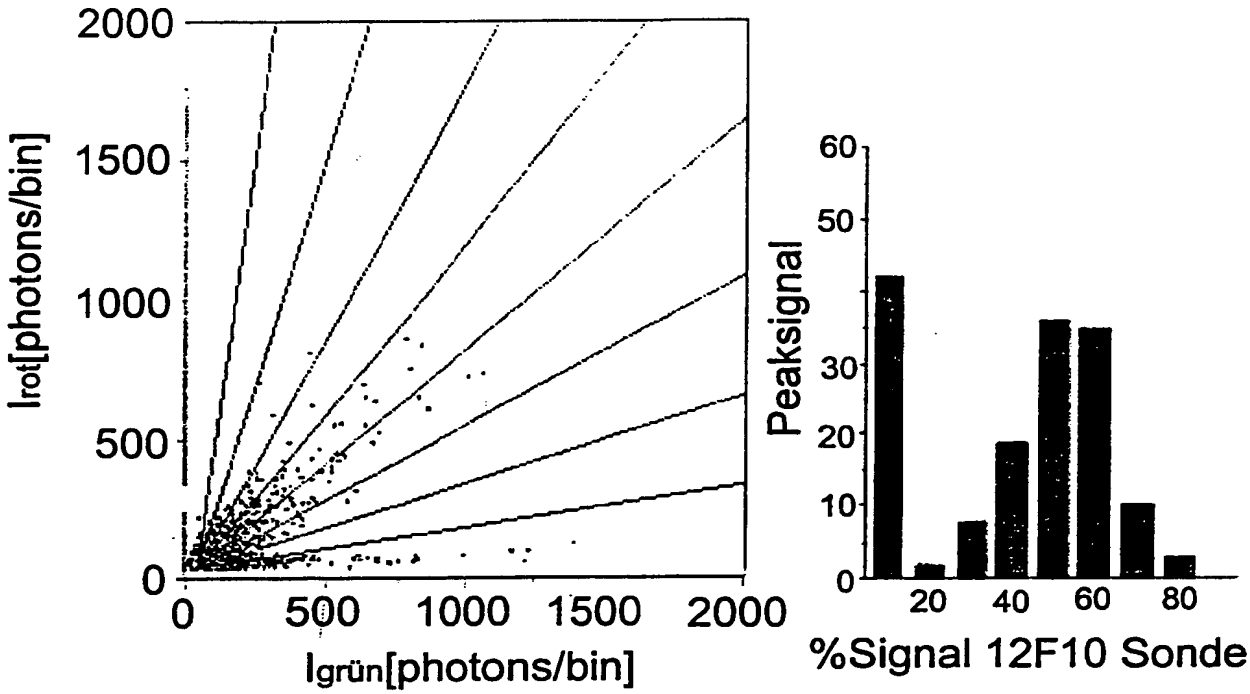

2000
1500
1000
500
0
Irot[photons/bin]
0
500
1000
1500
2000
Igrün[photons/bin]
60
50
30
20
10
0
Peaksignal
20
40
60
80
%Signal 12F10 Sonde

FIG.20

THIS PAGE BLANK (USPTO

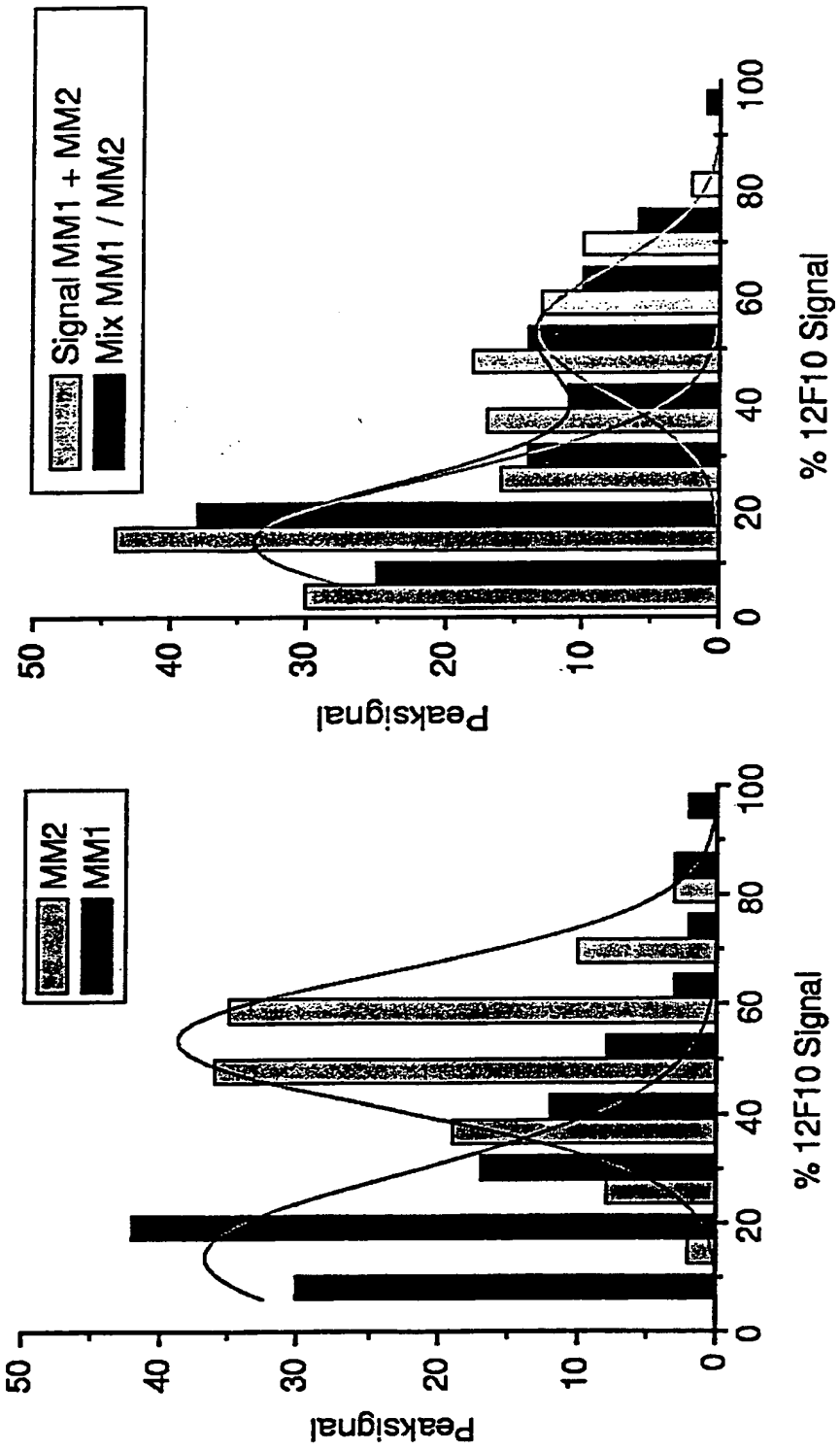

Signal MM1 + MM2
Mix MM1 / MM2
Peaksignal
% 12F10 Signal
MM2
MM1
Peaksignal
% 12F10 Signal

FIG.21

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/09468

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 99 62548 A (ADVANCED RESEARCH AND TECHNOLOGY INSTITUTE) 9 December 1999 (1999-12-09) page 3, line 13 -page 4, line 10	1-19
A	WO 96 04309 A (INNOGENETICS N.V.) 15 February 1996 (1996-02-15) the whole document	1-19
A	WO 94 13795 A (N.V. INNOGENETICS S.A.) 23 June 1994 (1994-06-23) the whole document	1-19
P,A	WO 99 66956 A (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 29 December 1999 (1999-12-29) abstract; claims	1-19

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 December 2000	02/01/2001

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Griffith, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 01471 A (AB SANGTEC MEDICAL) 15 January 1998 (1998-01-15) the whole document	1-19
A	WO 97 43649 A (E.-L. WINNACKER) 20 November 1997 (1997-11-20) abstract; claims	1-19
A	EP 0 544 942 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 9 June 1993 (1993-06-09) the whole document	1-19
A	WO 98 16833 A (XENOVA LIMITED) 23 April 1998 (1998-04-23)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/09468

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9962548	A	09-12-1999	AU	4322999 A	20-12-1999
WO 9604309	A	15-02-1996	AU	710952 B	30-09-1999
			AU	3223495 A	04-03-1996
			CA	2195672 A	15-02-1996
			EP	0772634 A	14-05-1997
			JP	10506381 T	23-06-1998
			US	6121003 A	19-09-2000
WO 9413795	A	23-06-1994	AT	165866 T	15-05-1998
			AU	690092 B	23-04-1998
			AU	5809794 A	04-07-1994
			CA	2150816 A	23-06-1994
			DE	69318420 D	10-06-1998
			DE	69318420 T	28-01-1999
			DK	673418 T	01-03-1999
			EP	0673418 A	27-09-1995
			ES	2118373 T	16-09-1998
			JP	2879975 B	05-04-1999
			JP	8502898 T	02-04-1996
			US	5843779 A	01-12-1998
			US	5861257 A	19-01-1999
			US	6010913 A	04-01-2000
WO 9966956	A	29-12-1999	AU	4957499 A	10-01-2000
WO 9801471	A	15-01-1998	AU	715797 B	10-02-2000
			AU	3563397 A	02-02-1998
			BR	9710175 A	11-01-2000
			CA	2259413 A	15-01-1998
			EP	0931094 A	28-07-1999
			NO	986218 A	30-12-1998
			NZ	333408 A	28-05-1999
WO 9743649	A	20-11-1997	EP	0914614 A	12-05-1999
EP 544942	A	09-06-1993	AT	185599 T	15-10-1999
			AU	707736 B	15-07-1999
			AU	2865697 A	04-12-1997
			AU	681071 B	21-08-1997
			AU	3256093 A	28-06-1993
			CA	2125298 A	10-06-1993
			DE	69230148 D	18-11-1999
			DE	69230148 T	04-05-2000
			DK	618968 T	10-04-2000
			WO	9311231 A	10-06-1993
			EP	0618968 A	12-10-1994
			EP	0911398 A	28-04-1999
			EP	0911390 A	28-04-1999
			EP	0909814 A	21-04-1999
			ES	2136654 T	01-12-1999
			JP	2000026498 A	25-01-2000
			JP	2000037188 A	08-02-2000
			JP	2000032983 A	02-02-2000
			JP	7507044 T	03-08-1995
WO 9816833	A	23-04-1998	AU	4311497 A	11-05-1998
			EP	0934525 A	11-08-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/09468

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9816833 A		GB 2335038 A	08-09-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internes Aktenzeichen
PCT/EP 00/09468

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/68 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	WO 99 62548 A (ADVANCED RESEARCH AND TECHNOLOGY INSTITUTE) 9. Dezember 1999 (1999-12-09) Seite 3, Zeile 13 -Seite 4, Zeile 10 ---	1-19
A	WO 96 04309 A (INNOGENETICS N.V.) 15. Februar 1996 (1996-02-15) das ganze Dokument ---	1-19
A	WO 94 13795 A (N.V. INNOGENETICS S.A.) 23. Juni 1994 (1994-06-23) das ganze Dokument ---	1-19
P,A	WO 99 66956 A (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 29. Dezember 1999 (1999-12-29) Zusammenfassung; Ansprüche ---	1-19
	-/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
20. Dezember 2000	02/01/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Griffith, G

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 98 01471 A (AB SANGTEC MEDICAL) 15. Januar 1998 (1998-01-15) das ganze Dokument	1-19
A	WO 97 43649 A (E.-L. WINNACKER) 20. November 1997 (1997-11-20) Zusammenfassung; Ansprüche	1-19
A	EP 0 544 942 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 9. Juni 1993 (1993-06-09) das ganze Dokument	1-19
A	WO 98 16833 A (XENOVA LIMITED) 23. April 1998 (1998-04-23)	

INTERNATIONALER [redacted]CHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Interna[redacted]es Aktenzeichen
PCT/EP 00/09468

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9962548	A	09-12-1999	AU 4322999	A	20-12-1999
WO 9604309	A	15-02-1996	AU 710952	B	30-09-1999
			AU 3223495	A	04-03-1996
			CA 2195672	A	15-02-1996
			EP 0772634	A	14-05-1997
			JP 10506381	T	23-06-1998
			US 6121003	A	19-09-2000
WO 9413795	A	23-06-1994	AT 165866	T	15-05-1998
			AU 690092	B	23-04-1998
			AU 5809794	A	04-07-1994
			CA 2150816	A	23-06-1994
			DE 69318420	D	10-06-1998
			DE 69318420	T	28-01-1999
			DK 673418	T	01-03-1999
			EP 0673418	A	27-09-1995
			ES 2118373	T	16-09-1998
			JP 2879975	B	05-04-1999
			JP 8502898	T	02-04-1996
			US 5843779	A	01-12-1998
			US 5861257	A	19-01-1999
			US 6010913	A	04-01-2000
WO 9966956	A	29-12-1999	AU 4957499	A	10-01-2000
WO 9801471	A	15-01-1998	AU 715797	B	10-02-2000
			AU 3563397	A	02-02-1998
			BR 9710175	A	11-01-2000
			CA 2259413	A	15-01-1998
			EP 0931094	A	28-07-1999
			NO 986218	A	30-12-1998
			NZ 333408	A	28-05-1999
WO 9743649	A	20-11-1997	EP 0914614	A	12-05-1999
EP 544942	A	09-06-1993	AT 185599	T	15-10-1999
			AU 707736	B	15-07-1999
			AU 2865697	A	04-12-1997
			AU 681071	B	21-08-1997
			AU 3256093	A	28-06-1993
			CA 2125298	A	10-06-1993
			DE 69230148	D	18-11-1999
			DE 69230148	T	04-05-2000
			DK 618968	T	10-04-2000
			WO 9311231	A	10-06-1993
			EP 0618968	A	12-10-1994
			EP 0911398	A	28-04-1999
			EP 0911390	A	28-04-1999
			EP 0909814	A	21-04-1999
			ES 2136654	T	01-12-1999
			JP 2000026498	A	25-01-2000
			JP 2000037188	A	08-02-2000
			JP 2000032983	A	02-02-2000
			JP 7507044	T	03-08-1995
WO 9816833	A	23-04-1998	AU 4311497	A	11-05-1998
			EP 0934525	A	11-08-1999

INTERNATIONALER [redacted]CHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In[redacted]es Aktenzeichen
PCT/EP 00/09468

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9816833 A		GB 2335038 A	08-09-1999

P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches Patentamt	European Patent Office	Office européen des brevets
Zweigstelle in Den Haag	Branch at The Hague	Département à La Haye

VON KREISLER SELTING & WERNER
z.H. Dr. Meyers
Deichmannhaus am Dom
D-50667 Köln
GERMANY

AwK | Sg | W | Da | Hi | HPJ | ME | TW | JH | KB

19. SEP. 2000

K

Aktenzeichen/File No./No. du Dossier	RS 105351 DE
Datum/Date	18. 09. 00

Das Europäische Patentamt übermittelt hiermit den Standardrecherchenbericht zu dem unten bezeichneten Antrag; Kopien der im Recherchenbericht angeführten Schriften werden in der Anlage beigefügt.

The European Patent Office herewith transmits the Standard Search Report relating to the request indicated below; copies of the documents cited in the search report are enclosed.

L'Office Européen des Brevets à l'honneur de vous transmettre ci-joint le Rapport de Recherche concernant la demande désignée ci-dessous; des copies des documents cités sont jointes.

Zeichen und Datum des Antrages Applicant's reference and date Références et date de la demande	000811de/Me/bk
Dokument, Gegenstand der Recherche Document subject of the search Objet de la recherche	DEA 19946546
Einreichungstag Filing date Date de dépôt	28/09/1999
Beanspruchte Priorität Priority claimed Priorité revendiquée	

OFFICE EUROPÉEN DES BREVETS
Pour le Vice-Président,

R. de Best

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Europäisches Patentamt

STANDARD RECHERCHENBERICHT

Antrag
RS 105351

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch
A	WO 99 62548 A (ADVANCED RESEARCH AND TECHNOLOGY INSTITUTE) 9. Dezember 1999 (1999-12-09) * Seite 3, Zeile 13 - Seite 4, Zeile 10 *	1,2
A	WO 96 04309 A (INNOGENETICS N.V.) 15. Februar 1996 (1996-02-15) * das ganze Dokument *	1,2
A	WO 94 13795 A (N.V. INNOGENETICS S.A.) 23. Juni 1994 (1994-06-23) * das ganze Dokument *	1,2
A	WO 99 66956 A (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 29. Dezember 1999 (1999-12-29) * Zusammenfassung; Ansprüche *	1,2
A	WO 98 01471 A (AB SANGTEC MEDICAL) 15. Januar 1998 (1998-01-15) * das ganze Dokument *	1,2
A	WO 97 43649 A (E.-L. WINNACKER) 20. November 1997 (1997-11-20) * Zusammenfassung; Ansprüche *	1,2
A	EP 0 544 942 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 9. Juni 1993 (1993-06-09) * das ganze Dokument *	1,2
A	WO 98 16833 A (XENOVA LIMITED) 23. April 1998 (1998-04-23)	1,2

RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.CL.7)

G01N

Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt

Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
8. September 2000	GRIFFITH, G

KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE

X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie
A : technologischer Hintergrund
O : nichtschriftliche Offenbarung
P : Zwischenliteratur

T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze
E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
D : in der Anmeldung angeführtes Dokument
L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument

& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument

EPO FORM 1503 03.82 (P04C19)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Europäisches Patentamt

STANDARD RECHERCHENBERICHT

Antrag
RS 105351

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch
A	WO 99 62548 A (ADVANCED RESEARCH AND TECHNOLOGY INSTITUTE) 9. Dezember 1999 (1999-12-09) * Seite 3, Zeile 13 - Seite 4, Zeile 10 *	1,2
A	WO 96 04309 A (INNOGENETICS N.V.) 15. Februar 1996 (1996-02-15) * das ganze Dokument *	1,2
A	WO 94 13795 A (N.V. INNOGENETICS S.A.) 23. Juni 1994 (1994-06-23) * das ganze Dokument *	1,2
A	WO 99 66956 A (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 29. Dezember 1999 (1999-12-29) * Zusammenfassung; Ansprüche *	1,2
A	WO 98 01471 A (AB SANGTEC MEDICAL) 15. Januar 1998 (1998-01-15) * das ganze Dokument *	1,2
A	WO 97 43649 A (E.-L. WINNACKER) 20. November 1997 (1997-11-20) * Zusammenfassung; Ansprüche *	1,2
A	EP 0 544 942 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 9. Juni 1993 (1993-06-09) * das ganze Dokument *	1,2
A	WO 98 16833 A (XENOVA LIMITED) 23. April 1998 (1998-04-23)	1,2

RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.CL.7)

G01N

Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt

Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
8. September 2000	GRIFFITH, G

KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE

X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie
A : technologischer Hintergrund
O : nichtschriftliche Offenbarung
P : Zwischenliteratur

T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze
E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
D : in der Anmeldung angeführtes Dokument
L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument

& : Mitglied der gleichen Patentfamilie,übereinstimmendes Dokument

EPO FORM 1503 03.82 (P04C19)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANHANG ZUM RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE STANDARDRECHERCHE NR.

RS 105351

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

08-09-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9962548	A	09-12-1999	AU	4322999 A	20-12-1999
WO 9604309	A	15-02-1996	AU	710952 B	30-09-1999
			AU	3223495 A	04-03-1996
			CA	2195672 A	15-02-1996
			EP	0772634 A	14-05-1997
			JP	10506381 T	23-06-1998
WO 9413795	A	23-06-1994	AT	165866 T	15-05-1998
			AU	690092 B	23-04-1998
			AU	5809794 A	04-07-1994
			CA	2150816 A	23-06-1994
			DE	69318420 D	10-06-1998
			DE	69318420 T	28-01-1999
			EP	0673418 A	27-09-1995
			ES	2118373 T	16-09-1998
			JP	2879975 B	05-04-1999
			JP	8502898 T	02-04-1996
			US	5843779 A	01-12-1998
			US	5861257 A	19-01-1999
			US	6010913 A	04-01-2000
WO 9966956	A	29-12-1999	AU	4957499 A	10-01-2000
WO 9801471	A	15-01-1998	AU	715797 B	10-02-2000
			AU	3563397 A	02-02-1998
			BR	9710175 A	11-01-2000
			CA	2259413 A	15-01-1998
			EP	0931094 A	28-07-1999
			NO	986218 A	30-12-1998
			NZ	333408 A	28-05-1999
WO 9743649	A	20-11-1997	EP	0914614 A	12-05-1999
EP 544942	A	09-06-1993	AT	185599 T	15-10-1999
			AU	707736 B	15-07-1999
			AU	2865697 A	04-12-1997
			AU	681071 B	21-08-1997
			AU	3256093 A	28-06-1993
			CA	2125298 A	10-06-1993
			DE	69230148 D	18-11-1999
			DE	69230148 T	04-05-2000
			WO	9311231 A	10-06-1993
			EP	0618968 A	12-10-1994
			EP	0911398 A	28-04-1999
			EP	0911390 A	28-04-1999

EPO FORM P0471

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANHANG ZUM RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE STANDARDRECHERCHE NR.

RS 105351

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

08-09-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 544942 A		EP 0909814 A	21-04-1999
		ES 2136654 T	01-12-1999
		JP 2000026498 A	25-01-2000
		JP 2000037188 A	08-02-2000
		JP 2000032983 A	02-02-2000
		JP 7507044 T	03-08-1995
WO 9816833 A	23-04-1998	AU 4311497 A	11-05-1998
		EP 0934525 A	11-08-1999
		GB 2335038 A	08-09-1999

EPO FORM P0471

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

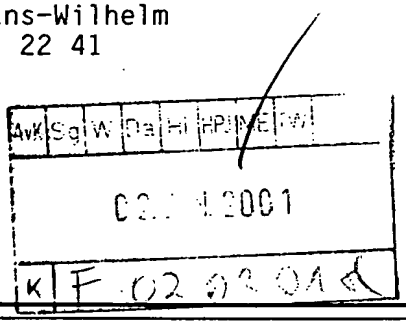
Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

An
MEYERS , Hans-Wilhelm
P.O. Box 10 22 41
50462 Köln
GERMANY



Absendedatum *(Tag/Monat/Jahr)* 02/01/2001	
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 002457woMegn	**WEITERES VORGEHEN** siehe Punkte 1 und 4 unten
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 09468	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)* 28/09/2000
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS AG	

1. [X] Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

 Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:
 Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

 Bis wann sind Änderungen einzureichen?

 Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

 Wo sind Änderungen einzureichen?

 Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20, Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

 Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. [] Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.

3. [] **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

 [] der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

 [] noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

 Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis.1 bzw. 90 bis.3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

 Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

 Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Jaap Hurenkamp

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.
Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunumerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der dieinternationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

NSDOCID: <XSISA220NODEP4_1_>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

i) der Anspruch unverändert ist;

ii) der Anspruch gestrichen worden ist;

iii) der Anspruch neu ist;

iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;

v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."

2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."

3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt."Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."

4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragen Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amts sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

INSDOCID: <XSISA220NODEP4_I_>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	**WEITERES VORGEHEN**	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
002457woMegn		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	(Frühestes) Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Jahr)*
PCT/EP 00/09468	28/09/2000	28/09/1999
Anmelder		
EVOTEC BIOSYSTEMS AG		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

[X] Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. **Grundlage des Berichts**

 a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

 [] Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

 b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

 [] in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

 [] zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

 [] bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

 [] bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

 [] Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

 [] Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. [] **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. [] **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

 [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

 [] wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

 [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

 [] wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

 [X] wie vom Anmelder vorgeschlagen

 [] keine der Abb.

 [] weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

 [] weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/09468

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/68 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	WO 99 62548 A (ADVANCED RESEARCH AND TECHNOLOGY INSTITUTE) 9. Dezember 1999 (1999-12-09) Seite 3, Zeile 13 -Seite 4, Zeile 10 ---	1-19
A	WO 96 04309 A (INNOGENETICS N.V.) 15. Februar 1996 (1996-02-15) das ganze Dokument ---	1-19
A	WO 94 13795 A (N.V. INNOGENETICS S.A.) 23. Juni 1994 (1994-06-23) das ganze Dokument ---	1-19
P,A	WO 99 66956 A (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 29. Dezember 1999 (1999-12-29) Zusammenfassung; Ansprüche --- -/--	1-19

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
20. Dezember 2000	02/01/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Griffith, G

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/09468

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 98 01471 A (AB SANGTEC MEDICAL) 15. Januar 1998 (1998-01-15) das ganze Dokument ---	1-19
A	WO 97 43649 A (E.-L. WINNACKER) 20. November 1997 (1997-11-20) Zusammenfassung; Ansprüche ---	1-19
A	EP 0 544 942 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 9. Juni 1993 (1993-06-09) das ganze Dokument ---	1-19
A	WO 98 16833 A (XENOVA LIMITED) 23. April 1998 (1998-04-23) -----	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/09468

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9962548 A	09-12-1999	AU 4322999 A	20-12-1999
WO 9604309 A	15-02-1996	AU 710952 B	30-09-1999
		AU 3223495 A	04-03-1996
		CA 2195672 A	15-02-1996
		EP 0772634 A	14-05-1997
		JP 10506381 T	23-06-1998
		US 6121003 A	19-09-2000
WO 9413795 A	23-06-1994	AT 165866 T	15-05-1998
		AU 690092 B	23-04-1998
		AU 5809794 A	04-07-1994
		CA 2150816 A	23-06-1994
		DE 69318420 D	10-06-1998
		DE 69318420 T	28-01-1999
		DK 673418 T	01-03-1999
		EP 0673418 A	27-09-1995
		ES 2118373 T	16-09-1998
		JP 2879975 B	05-04-1999
		JP 8502898 T	02-04-1996
		US 5843779 A	01-12-1998
		US 5861257 A	19-01-1999
		US 6010913 A	04-01-2000
WO 9966956 A	29-12-1999	AU 4957499 A	10-01-2000
WO 9801471 A	15-01-1998	AU 715797 B	10-02-2000
		AU 3563397 A	02-02-1998
		BR 9710175 A	11-01-2000
		CA 2259413 A	15-01-1998
		EP 0931094 A	28-07-1999
		NO 986218 A	30-12-1998
		NZ 333408 A	28-05-1999
WO 9743649 A	20-11-1997	EP 0914614 A	12-05-1999
EP 544942 A	09-06-1993	AT 185599 T	15-10-1999
		AU 707736 B	15-07-1999
		AU 2865697 A	04-12-1997
		AU 681071 B	21-08-1997
		AU 3256093 A	28-06-1993
		CA 2125298 A	10-06-1993
		DE 69230148 D	18-11-1999
		DE 69230148 T	04-05-2000
		DK 618968 T	10-04-2000
		WO 9311231 A	10-06-1993
		EP 0618968 A	12-10-1994
		EP 0911398 A	28-04-1999
		EP 0911390 A	28-04-1999
		EP 0909814 A	21-04-1999
		ES 2136654 T	01-12-1999
		JP 2000026498 A	25-01-2000
		JP 2000037188 A	08-02-2000
		JP 2000032983 A	02-02-2000
		JP 7507044 T	03-08-1995
WO 9816833 A	23-04-1998	AU 4311497 A	11-05-1998
		EP 0934525 A	11-08-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/09468

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9816833 A		GB 2335038 A	08-09-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 14 June 2001 (14.06.01)	
International application No. PCT/EP00/09468	**Applicant's or agent's file reference** 002457woMegn
International filing date (day/month/year) 28 September 2000 (28.09.00)	**Priority date** (day/month/year) 28 September 1999 (28.09.99)
Applicant BIESCHKE, Jan et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

[X] in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

13 March 2001 (13.03.01)

[] in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election [X] was

[] was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO **34, chemin des Colombettes** **1211 Geneva 20, Switzerland**	Authorized officer Zakaria EL KHODARY
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 002457woMegn	**WEITERES VORGEHEN**	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 09468	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)* 28/09/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Jahr)* 28/09/1999
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS AG		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

[X] Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. **Grundlage des Berichts**

 a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

 [] Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

 b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

 [] in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

 [] zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

 [] bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

 [] bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

 [] Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

 [] Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. [] **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. [] **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

 [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

 [] wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

 [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

 [] wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

 [X] wie vom Anmelder vorgeschlagen

 [] keine der Abb.

 [] weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

 [] weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
[redacted]EP 00/09468

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/68 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	WO 99 62548 A (ADVANCED RESEARCH AND TECHNOLOGY INSTITUTE) 9. Dezember 1999 (1999-12-09) Seite 3, Zeile 13 -Seite 4, Zeile 10 ---	1-19
A	WO 96 04309 A (INNOGENETICS N.V.) 15. Februar 1996 (1996-02-15) das ganze Dokument ---	1-19
A	WO 94 13795 A (N.V. INNOGENETICS S.A.) 23. Juni 1994 (1994-06-23) das ganze Dokument ---	1-19
P,A	WO 99 66956 A (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 29. Dezember 1999 (1999-12-29) Zusammenfassung; Ansprüche ---	1-19

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
20. Dezember 2000	02/01/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Griffith, G

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
[redacted]EP 00/09468

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANG[redacted]ENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 98 01471 A (AB SANGTEC MEDICAL) 15. Januar 1998 (1998-01-15) das ganze Dokument	1-19
A	WO 97 43649 A (E.-L. WINNACKER) 20. November 1997 (1997-11-20) Zusammenfassung; Ansprüche	1-19
A	EP 0 544 942 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 9. Juni 1993 (1993-06-09) das ganze Dokument	1-19
A	WO 98 16833 A (XENOVA LIMITED) 23. April 1998 (1998-04-23)	

1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
EP 00/09468

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9962548	A	09-12-1999	AU	4322999 A	20-12-1999
WO 9604309	A	15-02-1996	AU	710952 B	30-09-1999
			AU	3223495 A	04-03-1996
			CA	2195672 A	15-02-1996
			EP	0772634 A	14-05-1997
			JP	10506381 T	23-06-1998
			US	6121003 A	19-09-2000
WO 9413795	A	23-06-1994	AT	165866 T	15-05-1998
			AU	690092 B	23-04-1998
			AU	5809794 A	04-07-1994
			CA	2150816 A	23-06-1994
			DE	69318420 D	10-06-1998
			DE	69318420 T	28-01-1999
			DK	673418 T	01-03-1999
			EP	0673418 A	27-09-1995
			ES	2118373 T	16-09-1998
			JP	2879975 B	05-04-1999
			JP	8502898 T	02-04-1996
			US	5843779 A	01-12-1998
			US	5861257 A	19-01-1999
			US	6010913 A	04-01-2000
WO 9966956	A	29-12-1999	AU	4957499 A	10-01-2000
WO 9801471	A	15-01-1998	AU	715797 B	10-02-2000
			AU	3563397 A	02-02-1998
			BR	9710175 A	11-01-2000
			CA	2259413 A	15-01-1998
			EP	0931094 A	28-07-1999
			NO	986218 A	30-12-1998
			NZ	333408 A	28-05-1999
WO 9743649	A	20-11-1997	EP	0914614 A	12-05-1999
EP 544942	A	09-06-1993	AT	185599 T	15-10-1999
			AU	707736 B	15-07-1999
			AU	2865697 A	04-12-1997
			AU	681071 B	21-08-1997
			AU	3256093 A	28-06-1993
			CA	2125298 A	10-06-1993
			DE	69230148 D	18-11-1999
			DE	69230148 T	04-05-2000
			DK	618968 T	10-04-2000
			WO	9311231 A	10-06-1993
			EP	0618968 A	12-10-1994
			EP	0911398 A	28-04-1999
			EP	0911390 A	28-04-1999
			EP	0909814 A	21-04-1999
			ES	2136654 T	01-12-1999
			JP	2000026498 A	25-01-2000
			JP	2000037188 A	08-02-2000
			JP	2000032983 A	02-02-2000
			JP	7507044 T	03-08-1995
WO 9816833	A	23-04-1998	AU	4311497 A	11-05-1998
			EP	0934525 A	11-08-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
[redacted]EP 00/09468

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9816833 A		GB 2335038 A	08-09-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

2

Applicant's or agent's file reference 002457woMegn	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP00/09468	International filing date (*day/month/year*) 28 September 2000 (28.09.00)	Priority date (*day/month/year*) 28 September 1999 (28.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/68		
Applicant EVOTEC OAI AG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
13 March 2001 (13.03.01)	31 August 2001 (31.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP00/09468

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

☒ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-49, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. 1-19, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☒ the drawings, sheets/fig 1/21 - 21/21, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

None of the documents cited in the international search report relate to a method for determining and characterizing particles by means of at least two different detectable probes in a sample, the relationship between the bound probes being established by determining particles and this determination taking place on the basis of individual particles. The claimed invention therefore appears to meet the criteria stipulated by PCT Article 33(2) and (3).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

D

T 4

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 04 SEP 2001
WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	**WEITERES VORGEHEN**	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
002457wo/Me/lw		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Tag)*
PCT/EP00/09468	28/09/2000	28/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/68		
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

 ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

 - I ☒ Grundlage des Berichts
 - II ☐ Priorität
 - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags	Datum der Fertigstellung dieses Berichts
13/03/2001	31.08.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Linker, W Tel. Nr. +49 89 2399 8703

Formblatt PCT/IPEA/409 (Deckblatt) (Januar 1994)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/09468

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-49 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-19 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/21-21/21 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

 Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

 - ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
 - ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
 - ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

 - ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
 - ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

 (Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen;sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja:	Ansprüche	1-19
	Nein:	Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja:	Ansprüche	1-19
	Nein:	Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja:	Ansprüche	1-19
	Nein:	Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
 siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Keines der im internationalen Recherchenbericht genannten Dokumente betrifft ein Verfahren zur Bestimmung und Charakterisierung von Partikeln mittels mindestens zweier unterschiedlicher detektierbarer Sonden in einer Probe, wobei das Verhältnis der gebundenen Sonden zueinander durch Bestimmung auf Basis von einzelnen Partikeln erfolgt. Die beanspruchte Erfindung scheint daher die in Artikel 33(2) und (3) genannten Kriterien zu erfüllen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Postfach 10 22 41
50462 Köln
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 02 April 2002 (02.04.02)	
Applicant's or agent's file reference 002457woMegn	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/EP00/09468	**International filing date** (day/month/year) 28 September 2000 (28.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

[X] the applicant [] the inventor [] the agent [] the common representative

Name and Address

EVOTEC BIOSYSTEMS AG
Schnackenburgallee 114
22525 Hamburg
Germany

State of Nationality	State of Residence
DE	DE

Telephone No.:

Facsimile No.:

Teleprinter No.:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

[] the person [X] the name [] the address [] the nationality [] the residence

Name and Address

EVOTEC OAI AG
Schnackenburgallee 114
22525 Hamburg
Germany

State of Nationality	State of Residence
DE	DE

Telephone No.:

Facsimile No.:

Teleprinter No.:

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

[X] the receiving Office
[] the International Searching Authority
[] the International Preliminary Examining Authority
[] the designated Offices concerned
[X] the elected Offices concerned
[] other:

The International Bureau of WIPO **34, chemin des Colombettes** **1211 Geneva 20, Switzerland**	Authorized officer Erich LORIS
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)